UNIVERSITY OF
LIBRARY
MAR 4 '52

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena
Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

Vol. VIII. – Fasc. 1 15. I. 1952 Fr. 3.–

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

A. Kastler: Quelques réflexions à propos des phénomènes de résonance magnétique dans le domaine des radiofréquences . . . 1

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

F. A. Alves: The Non-identity of Dihydroeuphol and Dihydrobasseol . . . 10
M. Portmann et C. Portmann (Mme): Innervation de la bandelette sillonnée (limbus laminae spiralis) chez le chat . 11
Lucie Arvy et M. Gabe: Particularités morphologiques des corpora allata chez les Leptophlebiidae (Ephemeroptera) 12
J. A. Roper: Production of Heterozygous Diploids in Filamentous Fungi . . . 14
G. Colombo: L'accorciamento dei cromosomi nella mitosi e nella meiosi . . . 15
H. R. Schinz, Hedi Fritz-Niggli und E. Frey: Wirkung ultraharter Strahlung (31-Me V-Betatron) auf die Eier von *Drosophila melanogaster* . . . 16
R. Thomas, M. Steinert, S. Gothié et J. Brachet: La spécifité biologique des acides désoxyribonucléiques de diverses espèces animales . . . 18
E. R. Gabrieli and M. Campani: The Effect of Reticulo-Endothelial Blockade on Dermal Spreading of India Ink . 19
R. Amprino: Autoradiographic Analysis of the Distribution of Labelled Ca and P in Bones . . . 20
Jo Nordmann, R. Nordmann et Odette Gauchery: L'utilisation du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium pour l'étude de l'activité déshydrogénasique des mitochondries . . . 22
G. Kuschinsky, F. Turba und I. Köhler: Über das Verschwinden von Adenosintriphosphat bei der Superpräzipitation von Aktomyosin-Gel . . . 23
E. Cutolo e Noris Siliprandi: Azione dell'insulina e della difosfotiamina sull'ATP (Adenosinatrifosfato) del fegato. 24
V. Bolcato, M. E. Scevola, and M. A. Tisselli: Triosephosphates and Pyruvic Acid Intermediates in Fermentations of Pentoses by Living Cells of *Clostridium Acetobutylicum* . . . 25
J. Szulmajster, Marianne Grunberg-Manago et Colette Delavier: Utilisation du citrate par *Escherichia coli*. 26
F. H. Schwarzenbach: Ersatz von β-Indolyl-Essigsäure im β-Karotin-Test durch Vitamin E (Dl-α-Tocopherol) und Vitamin K (Roche 1–6722) . . . 28
A. Monroy and Marina de Nicola: The Pigment Granules of the Egg and Embryo of the Sea-Urchin *Paracentrotus lividus* . . . 29
J. H. Birnie, K. E. Blackmore, and H. Heller: Changes in Water Diuresis and Vasopressin Inactivation in Mice Fed on Protein Deficient Diets . . . 30
V. Erspamer and A. Ottolenghi: Antidiuretic Action of Small Doses of Enteramine Extracts in the Rat . . . 31

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Grating Spectrum of Iron. By A. Gatterer (Specola Vaticana, Città del Vaticano 1951) (Ref. E. Mischer) . . . 33
Einführung in die chemische Thermodynamik. Von Gustav Kortüm (Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1949) (Ref. F. Grün) . . . 33
Comparative Animal Physiology. By C. L. Prosser (W. B. Saunders Company, Philadelphia and London 1950) (Ref. A. Monroy) . . . 34

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Explicationes: C. Regel: Zur Klimaänderung der Gegenwart . . . 34
Studiorum progressus: A. Ek, H. Kissman, J. B. Patrick, and B. Witkop: Chemical Contributions to the Mechanism of the Biological Oxidation of Tryptophan . . . 36
Studiorum progressus: R. Marbet und A. Winterstein: Zur Kenntnis der Mukopolysaccharide, insbesondere der Heparine . . . 41

Neuerscheinung

DR. ING. KARL KUHLMANN

EM. PROFESSOR AN DER EIDG. TECHN. HOCHSCHULE IN ZÜRICH

THEORETISCHE ELEKTROTECHNIK

BAND III

GRUNDZÜGE DER THEORIE ELEKTRISCHER MASCHINEN

(1952) 546 Seiten mit 328 Figuren in Ganzleinen gebunden Fr. 74.90, broschiert Fr. 68.65

Der nunmehr vorliegende Band III der Theoretischen Elektrotechnik von Prof. Dr. KUHLMANN enthält in Fortsetzung des Stoffes des im Druck befindlichen Bandes I (Physikalische Grundlagen der Theoretischen Elektrotechnik) und des bereits erschienenen Bandes II (Grundzüge der Theorie des Wechselstromkreises und des einphasigen Transformators) die besonderen Grundlagen für das Verstehen des konstruktiven Aufbaues der elektrischen Maschinen und der in ihnen sich abspielenden Vorgänge. Sowohl der elektrische Maschinen bauende als auch der sie verwendende Ingenieur dürfte außer dem Studierenden der Elektrotechnik in diesem Band III alles das vorfinden, was hier von Interesse ist und als allgemeingültig für alle Maschinen der Gleich- und Wechselstromtechnik angesehen werden kann.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia VIII/1

Georg Endress, Basel
Ganz & Co., Zürich
CIBA AG., Basel
Verlag Birkhäuser AG., Basel
Schwitter AG., Basel
Cilag AG., Schaffhausen
H. R. Sauerländer & Co., Aarau
E. Mettler, Zürich

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern bei der Post abonniert werden:
EXPERIENTIA can be subscribed directly through any Post Office in the following countries:

Belgien-Luxemburg, Dänemark, Schweden, Portugal, Italien
Holland, Norwegen, Finnland, Marokko, Deutschland

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Prix du numéro fr. 3.–; abonnement pour un an fr. 28.– pour la Suisse; pour l'étranger fr. 34.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 28.–, im Ausland sFr. 34.–; die Einzelnummer kostet Fr. 3.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. Il prezzo del singolo fascicolo è di fr. 3.–. L'abbonamento annuo è di fr. 28.– per la Svizzera; all'estero fr. 34.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price per number is fr. 3.–, by annual subscription by inland-mail fr. 28.–; other countries fr. 34.–. Prices in Swiss currency.

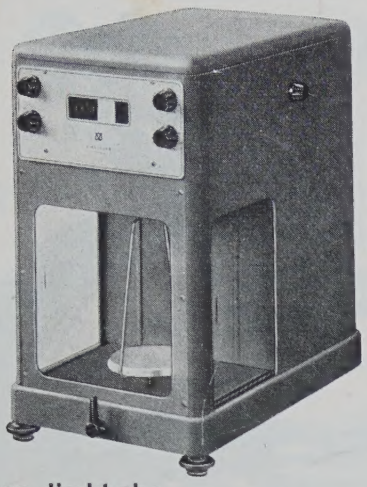
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1952 by Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstraße 15, Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by E. Birkhäuser & Cie. AG., Basel

64-06676

METTLER Analysenwaagen



Sie lesen direkt ab:

genau
schnell
einfach
sicher

Gewicht:
123,7306 g

Verlangen Sie unverbindlich Offerte oder Demonstration

E. METTLER Fabrik für Analysenwaagen
ZÜRICH 1
Pelikanstr. 19, Tel. (051) 25 25 70

Fielden
TEKTOR

das in jedem Labor unentbehrliche

Universal-Kontroll- und Steuergerät

betätigt ein Relais, wenn ein in seiner Ausdehnung durch eine Elektrode zu bestimmendes H.-F.-Feld gestört wird.

Einige typische Anwendungen:

Niveau- und Temperatur- sowie Flammen- und Durchflußmengensteuerung, ebenso Druckkontrolle, Tropfenzähler usw.

Weitere Fielden-Instrumente:

Relative Luftfeuchtigkeits-Meßgeräte, Modernste Nachlauf-Schreibgeräte, Druck- und Durchflußmengenanzeige- und Schreibinstrumente, Meßgeräte zur genauesten Bestimmung der Kapazitätsänderung.

Auskünfte, Vorführung und Offerten durch
Georg Endress, Basel 2, Tel. 2 03 64
Gartenstraße 81

Q1
A1E9
1.8

Clichés
in jeder Technik

SCHWITTER A-G

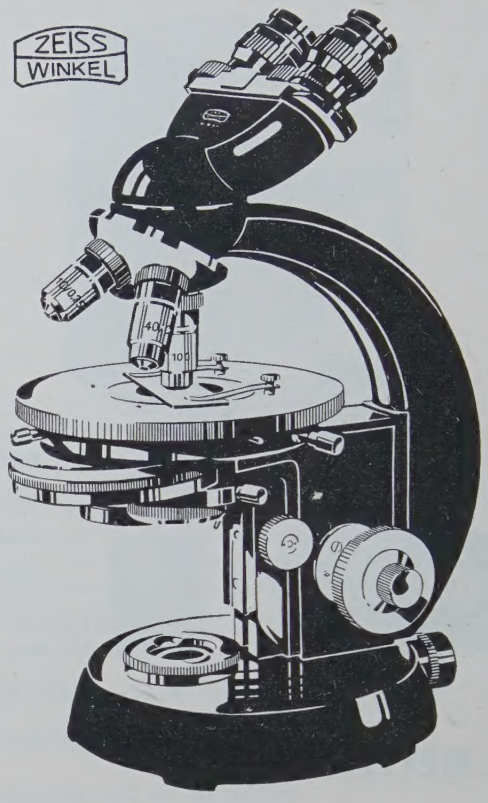
Basel / Zürich

NEUES **ZEISS**-WINKEL

STANDARD-MIKROSKOP GF 524

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

- **Lichtstarke Einbaubeleuchtung** (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie
- **Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung**
- **Neuartiger Gleittisch (Fettfriktion)**
- **Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive**
- **Vergrößerungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)**
- **Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkel--Kondensor**
- **Hervorragende Optik**



Auskunft und Vorführung durch die Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ & Co *Zürich*

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie

Revue suisse d'Hydrologie

Herausgegeben von der Hydrobiologischen Kommission der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft

Redaktion: O. Jaag, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich

Jährlich 2 Hefte. Abonnementspreis pro Jahr Fr. 20.– (Schweiz), Fr. 24.– (Ausland), Einzelheft Fr. 12.–

Vol. XIII, Fasc. 2, 1951.

INHALTSVERZEICHNIS · SOMMAIRE

Portner, C., La formation du sédiment calcaire du lac de Neuchâtel. – Huber-Pestalozzi, G., Über Gallertbildung bei *Cyclotella quadrijuncta* (Schröter) Hustedt. – Schmassmann, H. J., Untersuchungen über den Stoffhaushalt fließender Gewässer. – Thomasson, K., Beiträge zur Kenntnis des Planktons einiger Seen im Nordschwedischen Hochgebirge. – Novel, E., De quelques souches microbiennes de genres *Escherichia* et *Aerobacter* isolées de l'eau du Léman. – Corti, U. A., La «Matrix» des Poissons, VI: Etudes oscillographiques sur la détermination du caractère nocif de différentes eaux usées de provenance industrielle. – Buchbesprechungen.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL / SCHWEIZ

EXPERIENTIA

Vol. VIII - Fasc. 1 Pag. 1–44 15. I. 1952

Quelques réflexions à propos des phénomènes de résonance magnétique dans le domaine des radiofréquences[1]

Par A. KASTLER[2], Paris

Introduction

Le récent congrès de spectroscopie des radiofréquences qui s'est tenu à Amsterdam en septembre 1950[3] a mis en lumière le développement rapide, depuis la fin de la dernière guerre, des techniques de ce nouveau domaine d'investigation et a fait le point des résultats acquis qui se distinguent par leur précision et leur importance pour la connaissance des structures nucléaires.

On peut dire que le centre d'intérêt de la spectrographie se déplace actuellement du domaine des fréquences optiques et infra-rouges vers le domaine de la radio, et le spectroscopiste opticien, tout en se réjouissant de cet enrichissement de la spectroscopie, ne voit pas sans mélancolie lui échapper un domaine d'investigation dont il ignore les techniques. Il peut cependant, ici encore, donner des indications utiles soit en relevant les analogies avec la spectroscopie du domaine optique (car si les techniques diffèrent, les principes fondamentaux restent les mêmes: ici et là, les transitions spectrales sont régies par les mêmes lois quantiques) soit en conjuguant les techniques radioélectriques avec des méthodes d'investigations optiques.

Il est vrai que s'il y a des analogies profondes entre les transitions spectrales d'ordres de fréquences très différents, il y a aussi des différences caractéristiques: dans le domaine optique le pouvoir de résolution des appareils ne permet pas, le plus souvent, d'atteindre la «largeur naturelle» des raies spectrales alors que dans le domaine radio les bandes passantes des émetteurs et des récepteurs sont en général plus étroites que les bandes de résonance étudiées. Enfin, dans le domaine des basses fréquences, les probabilités d'émission spontanées qui jouent le rôle essentiel en optique, sont tout à fait négligeables par rapport aux probabilités d'émission induite par le rayonnement de sorte que l'aspect quantique des phénomènes s'atténue et que les modèles électromagnétiques classiques serrent la réalité de très près.

Ces diverses remarques s'appliquent tout particulièrement aux phénomènes de résonance magnétique qui présentent une connexion étroite avec l'effet Zeeman du domaine optique. Un niveau quantique paramagnétique (de moment magnétique différent de zéro) se subdivise, sous l'influence d'un champ extérieur et en particulier d'un champ magnétique, en plusieurs sous-niveaux énergétiquement distincts caractérisés par le nombre quantique magnétique m (m_j lorsqu'il s'agit d'un niveau électronique, m_i en cas de niveau nucléaire).

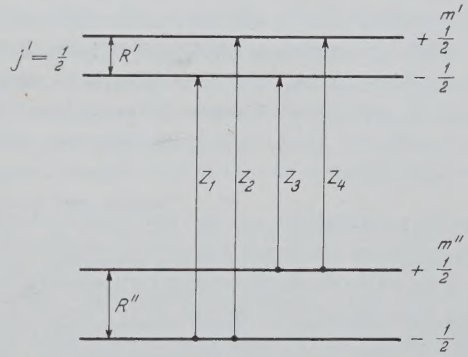


Fig. 1.

Les transitions entre sous-niveaux magnétiques de deux niveaux atomiques différents (transitions Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 de la figure 1) constituent les diverses composantes Zeeman d'une raie spectrale du domaine optique. Mais il existe également des transitions entre sous-niveaux magnétiques du même niveau atomique (transitions R' ou R'' de la figure 1). Ce sont ces transitions qui dans les champs accessibles sont du domaine des radiofréquences et qui correspondent aux phénomènes de résonance magnétique. Elles sont l'équivalent de transitions «dipolaires magnétiques» du domaine optique car elles sont liées à un changement d'orientation du moment magnétique de l'atome. Ici aussi le nombre quantique magnétique ne peut varier que d'une unité ($\Delta m = \pm 1$) et suivant le signe de Δm il y a absorption d'une vibration électromagnétique polarisée circulairement à droite ou à gauche dans le plan perpendiculaire au champ magnétique constant. Les transitions de résonance magnétique, prévues et recherchées depuis 1936 par GORTER[1], puis par ses élèves, ont été d'abord mises en évidence par la technique des rayons atomiques et moléculaires développée par RABI

[1] Cet article présente le développement de quelques idées exprimées par l'auteur à la Réunion internationale de spectroscopie de Bâle, 28–30 juin 1951.

[2] Laboratoire de Physique de l'Ecole normale supérieure, Paris.

[3] Physica *17*, 169 (1951).

[1] C. J. GORTER, Exper. *4*, 453 (1948).

et ses collaborateurs[1] lorsque ZAVOISKY en 1945[2] pour la résonance électronique et PURCELL[3] et BLOCH[4] en 1946 pour la résonance nucléaire ont montré que des méthodes radioélectriques permettent de déceler ces transitions dans la matière à l'état compact. SOUTIF[5] a donné une vue d'ensemble de ces nouvelles méthodes.

Nous avons montré, récemment, qu'à ces phénomènes de résonance magnétiques doivent être liés des effets magnéto-optiques dans le domaine des radiofréquences: résonance de la polarisation rotatoire magnétique ou de l'effet Faraday[6] et résonance de la biréfringence magnétique[7].

Le premier de ces effets a été mis en évidence à l'Institut de Physique de l'Université de Genève[8] et l'observation des physiciens genevois a été confirmée au Laboratoire de physique de l'Ecole normale supérieure à Paris[9]. Cet exemple montre, parmi d'autres, que les méthodes polarimétriques, courantes en optique classique, trouvent également un champ d'application utile dans l'optique des ondes hertziennes. Les méthodes polarimétriques sont, d'ailleurs, particulièrement indiquées dans un domaine où l'état naturel de l'onde électromagnétique est un état polarisé puisque les antennes émettrices et réceptrices possèdent des propriétés directives qui en font également des polariseurs et des analyseurs.

Dans les paragraphes qui suivent nous formons quelques suggestions concernant le développement et l'utilisation des méthodes de résonance radioélectrique. Tout d'abord, nous signalons l'intérêt qu'il y aurait à étudier par des techniques de résonance magnétique les effets photomagnétiques récemment mis en évidence par des mesures magnétostatiques délicates. Dans la deuxième partie nous montrons que l'existence d'un temps de relaxation réseau-réseau fait prévoir que des cristaux paramagnétiques, soumis à basse température à une résonance magnétique, deviennent des générateurs d'ondes hypersonores de fréquence définie. Enfin, nous signalons qu'en étendant à des monocristaux les recherches inaugurées à Göttingen par DEHMELT et KRUGER sur des poudres cristallines, on doit observer des effets d'anisotropie et de cohérence dont l'analyse peut devenir intéressante pour résoudre des problèmes de structure et pour déterminer des temps de relaxation.

[1] Voir: T. M. B. KELLOGG et S. MILLMAN, Rev. Mod. Physics *18*, 323 (1946).

[2] E. ZAVOISKY, J. Physics U.S.S.R. *9*, 211, 245, 299 (1945); *10*, 170, 197 (1946).

[3] E. M. PURCELL, A. C. TORREY et R. V. POUND, Phys. Rev. *69*, 37 (1946).

[4] F. BLOCH, Phys. Rev. *70*, 466 et 474 (1946).

[5] M. SOUTIF, J. Physique *10*, 61 D (1949).

[6] A. KASTLER, C. r. Acad. Sci. *228*, 1640 (1949).

[7] A. KASTLER, C. r. Acad. Sci. *231*, 1462 (1950).

[8] CH. RYTER, R. LACROIX et R. EXTERMANN, Helv. phys. acta *23*, 539 (1950); et Physica *17*, 440 (1951).

[9] J. SOUTIF-GUICHERD et M. LAMBINET, C. r. *231*, 1460 (1950).

I

Photomagnétisme. Action de la lumière sur les phénomènes de résonance magnétique

La connexion entre les transitions atomiques du domaine optique (transitions entre sous-niveaux magnétiques m de deux niveaux électroniques différents) et les transitions de résonance magnétique du domaine des radiofréquences (transitions entre sous-niveaux magnétiques m du même niveau électronique) a été récemment utilisée pour détecter par des procédés optiques certains phénomènes de résonance magnétique[1].

Le but de la présente note est d'attirer l'attention sur le fait qu'inversement il doit être possible de détecter par les procédés radioélectriques de la résonance magnétique les modifications que subissent les niveaux atomiques ou moléculaires sous l'influence d'une irradiation optique. En effet, les divers niveaux électroniques des atomes et des molécules (niveau fondamental, niveaux excités, niveaux métastables) possèdent des caractères magnétiques différents. Ceux caractérisés par un nombre quantique j (ou f) égal à zéro sont diamagnétiques, ceux caractérisés par un nombre j différent de zéro sont paramagnétiques et leur comportement magnétique (nombre de sous-niveaux m et dédoublement de ces sous-niveaux par un champ) dépend de la valeur de j et de celle du facteur de Landé g. Une excitation optique qui conduit du niveau fondamental vers des niveaux excités et indirectement vers des niveaux métastables, ou encore une destruction de ces niveaux métastables par une réexcitation optique (irradiation infra-rouge des substances phosphorescentes excitées), modifie le caractère magnétique de la substance irradiée. Des cas typiques de *photomagnétisme* (création ou destruction de centres paramagnétiques par irradiation optique) ont été étudiés récemment dans des substances solides à l'aide de méthodes de mesures magnétostatiques de haute sensibilité[2]. Mais les très faibles variations de la susceptibilité magnétique produites par une intervention optique sont difficiles à mettre en évidence et à mesurer par des procédés magnétostatiques. Ils peuvent être souvent masqués par le diamagnétisme (ou le paramagnétisme) général de la substance étudiée. La méthode de choix pour analyser les effets du photomagnétisme nous paraît être la méthode de résonance magnétique qui permet d'étudier les propriétés spécifiques d'un niveau atomique. Sa sensibilité a été affinée au point de permettre

[1] F. BITTER, Phys. Rev. *76*, 833 (1949). – J. BROSSEL et A. KASTLER, C. r. *229*, 1213 (1949). – J. BROSSEL, P. SAGALYN et F. BITTER, Phys. Rev. *79*, 225 (1950). – F. BITTER et J. BROSSEL, M.I.T. Technical report n° 176 (12. 9. 1950). – A. KASTLER, J. Physique *11*, 255 (1950); Commun. Congrès de Spectroscopie des Radiofréquences, Amsterdam 1950, parue dans: Physica *17*, 191 (1951); C. r. *232*, 953 (1951).

[2] G. N. LEWIS, M. CALVIN et M. KASHA, J. Chem. Physics *17*, 804 (1949). – A. B. SCOTT, L. P. BUPP *et al.*, Phys. Rev. *79*, 341, 346 (1950).

actuellement la détection de 10^{16} centres paramagnétiques par centimètre cube. Dans l'étude de la résonance magnétique du gaz NO[1] les molécules du niveau examiné (niveau $^2\pi_{3/2}$) se trouvaient à une concentration de l'ordre de 10^{16} centres/cm^3. Dans l'étude de la résonance magnétique des centres F dans les cristaux d'halogénures alcalins[2] l'étude a porté également sur de très faibles concentrations en centres actifs (10^{17}/cm^3). Il est possible d'obtenir des concentrations cent fois plus élevées en centres F (10^{19}/cm^3, SCOTT et BUPP, l. c.). Comme une irradiation par de la lumière correspondant à leur bande d'absorption permet de détruire ces centres, et comme leur disparition est liée à une diminution de la susceptibilité magnétique (SCOTT et BUPP, l. c.), cette action photomagnétique peut être suivie en fonction du temps par l'enregistrement de la résonance magnétique de ces centres au cours de l'illumination. D'autre part, en éclairant des substances phosphorescentes, et en particulier des substances dont l'état normal est diamagnétique, on peut certainement créer des états métastables paramagnétiques en concentration suffisante pour enregistrer leur résonance magnétique. LEWIS, CALVIN et KASHA ont montré que des molécules organiques aromatiques, en particulier de colorants, possèdent des niveaux de triplets métastables paramagnétiques[3]. En irradiant une solution solide de fluorescéine acide dans l'acide borique ils ont obtenu des molécules à l'état métastable paramagnétique à une concentration de l'ordre de $5 \cdot 10^{17}$ centres/cm^3. La sensibilité actuelle des méthodes radioélectriques de résonance est donc suffisante pour suivre la création et la destruction par la lumière de tels niveaux paramagnétiques et pour examiner la structure magnétique de ces niveaux.

D'autres exemples peuvent être fournis par les substances phosphorescentes minérales contenant à de faibles concentrations des activateurs qui sont, soit des ions paramagnétiques (Cu_{++}, Mn_{++} et ions de terres rares), soit des ions diamagnétiques (Bi, Tl). En les irradiant par des radiations de courte longueur d'onde, il est possible, à basse température surtout, de créer un nombre appréciable de centres phosphorescents qui sont probablement des ions d'activateur à des niveaux métastables. Ces niveaux métastables sont détruits par les radiations infra-rouges. Les méthodes de résonance magnétique permettant de déceler les niveaux paramagnétiques[4] et d'étudier leurs propriétés qui varient d'un niveau à l'autre (facteur de Landé g et anisotropie cristalline), un vaste champ de recherches s'ouvre ici pour le photomagnétisme et de précieux renseignements sur les mécanismes de phosphorescence sont à attendre de ces nouvelles méthodes.

On sait que l'intensité des signaux de résonance magnétique est limitée par la très faible différence entre les transitions d'absorption et les transitions d'émission induite, due au fait qu'à l'équilibre thermique la différence de population des sous-niveaux m d'un même état électronique est extrêmement faible. Or, en créant ou en détruisant des niveaux atomiques paramagnétiques par irradiation avec de la *lumière polarisée circulairement* on favorise la formation ou la destruction de certains sous-niveaux m plutôt que d'autres[1] et l'on doit pouvoir ainsi obtenir, même avec de très faibles concentrations, un signal de résonance appréciable. Ainsi, alors que la destruction d'un niveau paramagnétique par de la lumière naturelle doit affaiblir, en général, le signal de résonance magnétique de ce niveau, l'emploi de lumière circulaire peut renforcer ce signal. En changeant le sens de polarisation circulaire de la lumière, on pourra à volonté favoriser l'absorption ou l'émission induite de la transition radioélectrique. Cet effet spécifique de la lumière circulaire doit surtout être marqué aux basses températures où les temps de relaxation spin-réseau τ_1 sont de grande durée[2]. C'est, en effet, au bout d'un temps de l'ordre de τ_1 que le peuplement des niveaux m, par suite des échanges d'énergie avec le réseau, se redistribue suivant l'équilibre thermique[3].

Enfin, la présence de centres paramagnétiques a aussi une influence sur la largeur de bande et sur l'intensité des résonances nucléaires[4]. Les effets photomagnétiques peuvent donc également modifier les signaux de résonance nucléaire et être étudiés par l'analyse de ces signaux.

II

Influence possible d'une onde ultra-sonore sur la résonance magnétique nucléaire. Génération d'ondes hypersonores par la résonance magnétique électronique

La résonance magnétique nucléaire intéresse des radiofréquences de l'ordre de 16^6 à 10^8 hertz. Le signal

[1] R. BERINGER et J. G. CASTLE, Phys. Rev. *78*, 581 (1950).

[2] E. E. SCHNEIDER et T. S. ENGLAND, Commun. Congrès de Spectroscopie des Radiofréquences, Amsterdam 1950 (parue dans: Physica *17*, 191 (1951).

[3] G. N. LEWIS, M. CALVIN et M. KASHA, J. Chem. Physics *17*, 804 (1949). – A. B. SCOTT, L. P. BUPP *et al.*, Phys. Rev. *79*, 341 346 (1950). – Voir aussi: M. KASHA et R. V. NAUMAN, J. Chem. Phys. *17*, 516 (1949), et C. REID, J. Chem. Phys. *18*, 1673 (1950).

[4] T. S. ENGLAND et E. E. SCHNEIDER, Nature *166*, 437 (1950).

[1] F. BITTER, Phys. Rev. *76*, 833 (1949). – J. BROSSEL et A. KASTLER, C. r. *229*, 1213 (1949). - J. BROSSEL, P. SAGALYN et F. BITTER, Phys. Rev. *79*, 225 (1950). – F. BITTER et J. BROSSEL, M.I.T. Technical report n° 176 (12. 9. 1950). – A. KASTLER, J. Physique *11*, 255 (1950); Commun. Congrès de Spectroscopie des radiofréquences, Amsterdam 1950, parue dans: Physica *17*, 191 (1951); C. r. *232*, 953 (1951).

[2] C. J. GORTER, *Paramagnetic Relaxation* (Elsevier, Amsterdam, 1947). – R. J. BENZIE et A. H. COOKE, Proc. Phys. Soc. [A] *63*, 201 (1950). – A. H. COOKE, *Paramagnetic Relaxation Effects*, Reports Progress Physics *13*, 276 (1950).

[3] Le principe d'une méthode purement optique pour étudier la variation de peuplement des niveaux m d'un état métastable dans une substance phosphorescente par de la lumière polarisée circulairement a été exposé par l'auteur à la Réunion de spectroscopie de Bâle (juin 1951).

[4] F. BLOCH, W. W. HANSEN et M. PACKARD, Phys. Rev. *70*, 474 (1946). – N. BLOMBERGEN, E. M. PURCELL et R. V. POUND, Phys. Rev. *73*, 679 (1948). – N. BLOEMBERGEN, Thèse, Harvard 1948. – M. SOUTIF, Thèse, Paris 1950.

de résonance nucléaire (intensité, effet de saturation) dépend de l'interaction entre les spins nucléaires et les ondes thermoélastiques du réseau. Cette interaction détermine le temps de relaxation spin-réseau τ_1 [1].

Les ondes ultra-sonores qu'on sait produire atteignent des fréquences de 10^8 hertz[2]. Si on produit dans une substance une résonance magnétique nucléaire à une fréquence électromagnétique N, et si on soumet cette substance simultanément à une excitation ultra-sonore de même fréquence N, on y renforce artificiellement les ondes élastiques capables de réagir sélectivement avec les spins et l'on doit s'attendre à une modification des signaux radioélectriques de résonance, modification qui peut fournir des renseignements intéressants sur l'importance relative des divers mécanismes de relaxation réseau-spin[3]. On peut dire que l'excitation ultra-sonore crée, dans un étroit intervalle de fréquence, une température bien supérieure à la température normale du réseau. Comme les oscillateurs élastiques de fréquence N accordés à la fréquence de Larmor réagissent sélectivement avec les spins, la température de spin va s'élever et le signal électromagnétique de résonance va diminuer.

On peut aussi dire que, suivant le mécanisme envisagé par WALLER[4] l'onde élastique ultra-sonore modifie périodiquement le champ magnétique interne dû à l'action mutuelle des spins ainsi que le champ électrique interne susceptible d'agir sur le moment électrique quadrupolaire des noyaux. Ces champs se mettant à osciller à la fréquence N, produisent une «résonance interne» qui égalise les populations des niveaux de spin et entraîne une saturation interne qui diminue l'effet d'un champ magnétique oscillant extérieur. Dans le cas des spins électroniques comme dans celui des spins nucléaires la relaxation spin-réseau est due à différents mécanismes que nous rappelons[5]:

I. – Les ondes élastiques modifient périodiquement le *champ magnétique interne* en changeant la distance entre les ions ou noyaux paramagnétiques. L'échange d'énergie entre réseau et spin se fait par deux mécanismes:

a) par absorption ou émission d'un quantum élastique (phonon) par les spins, provoquant une transition entre les niveaux de spin (WALLER[4]).

b) par diffusion inélastique des phonons par les spins, diffusion stokes ou antistokes, sorte d'effet Raman où les phonons remplacent les photons (WALLER[4]).

II. – Les ondes élastiques modifient périodiquement le *champ électrique cristallin* dû à la charge des ions et des molécules dipôles (H_2O) ainsi que le champ interne des liaisons chimiques. Cette variation périodique du champ électrique interne peut influencer directement les spins soit par le mécanisme *a* (HEITLER et TELLER[1]) soit par le mécanisme *b* (FIERZ[2]).

III. – Une autre action sur les spins électroniques par l'intermédiaire de l'énergie orbitale est plus efficace: les niveaux orbitaux, décomposés par le champ cristallin, oscillent lorsque celui-ci se modifie, et grâce au couplage spin-orbite il y a transmission d'énergie aux spins (KRONIG, VAN VLECK[3]). Ici aussi l'échange d'énergie a lieu soit par émission-absorption (*a*) soit par diffusion inélastique (*b*) des phonons. Enfin, dans le cas des spins nucléaires, lorsque les noyaux possèdent un moment électrique quadrupolaire ($i > 1/2$), une variation périodique du champ électrique interne peut produire des changements d'orientation des noyaux par son action sur les moments quadrupolaires[4].

A haute température (température ordinaire et azote liquide) les mécanismes de diffusion *b* prédominent. Ce sont des effets non sélectifs qui sont assurés par les phonons de toutes fréquences. A basse température (hélium liquide) les échanges directs d'absorption-émission (*a*) acquièrent une importance prédominante. Ces mécanismes *a* sont sélectifs, ce sont des mécanismes de «résonance» intéressant des phonons de fréquence déterminée N, égale à la fréquence de Larmor entre niveaux de spin:

$$W = h N = g \mu_B H. \qquad (1)$$

Même à température ordinaire où, dans un réseau en équilibre thermique, la probabilité des transitions directes *a* est faible par rapport à celle des transitions *b*, le nombre des phonons échangés par le mécanisme *a* peut jouer un rôle essentiel lorsque le niveau d'énergie des oscillations du réseau est artificiellement accru dans l'intervalle de fréquence favorable. En excitant dans la substance une onde ultra-sonore de fréquence N satisfaisant à la relation de résonance (1) on amplifie donc dans les échanges réseau-spin l'importance des mécanismes *a* par rapport aux mécanismes *b* et l'on peut étudier l'effet produit sur le temps de relaxation τ_1 qui dépend des divers mécanismes. On prévoit également un effet d'une onde ultra-sonore de fréquence $2N$, double de celle de la résonance magnétique. Cet effet correspond à la règle de sélection $\Delta m = \pm 2$ du système de spin considéré dans son ensemble[5].

Effet réciproque: Un cristal soumis à la résonance magnétique électronique est un générateur d'ondes hypersonores.

Les phénomènes d'absorption paramagnétique soit dans le domaine non résonnant (GORTER, BENZIE et

[1] M. SOUTIF, J. Physique *10*, 61 [D] (1949).

[2] L. BERGMANN, *Der Ultraschall* (V. D. I.-Verlag, Berlin 1942), p. 34.

[3] P. GRIVET et M. SOUTIF m'ont informé qu'ils ont envisagé dès 1949 une influence des ondes ultra-sonores sur la résonance magnétique nucléaire et qu'ils ont projeté des expériences pour la mettre en évidence.

[4] I. WALLER, Z. Physik *79*, 370 (1932).

[5] C. J. GORTER, *Paramagnetic Relaxation* (Elsevier, Amsterdam 1947). – A. H. COOKE, Reports Progress Physics *13*, 276 (1950).

[1] W. HEITLER et E. TELLER, Proc. Roy. Soc. *155*, 629 (1936).

[2] M. FIERZ, Physica *5*, 433 (1938).

[3] R. KRONIG, Physica *6*, 33 (1939). – J. H. VAN VLECK, Phys. Rev. *57*, 426 (1940).

[4] R. V. POUND, Phys. Rev. *79*, 685 (1950).

[5] N. BLOEMBERGEN, E. M. PURCELL et R. V. POUND, Phys. Rev. *73*, 679 (1948).

COOKE[1]), soit dans les bandes de résonance électronique ou nucléaire, augmentent la température du système de spin[2] et entraînent, par la voie de la relaxation spin-réseau, une élévation de la température du réseau. C'est en mesurant cette augmentation de température du réseau par des méthodes thermométriques que les phénomènes de relaxation paramagnétique ont été détectés à partir de 1935 (GORTER, l. c.). Simultanément ont été développées des méthodes radioélectriques permettant d'étudier la modification du système de spin sous l'influence d'un champ magnétique oscillant. La transmission de l'énergie excédentaire des spins au réseau se fait par les mécanismes précédemment mentionnés. Dans le cas de la résonance électronique des ions dans les cristaux, les temps de relaxation spin-spin sont en général beaucoup plus courts que les temps de relaxation spin-réseau. CASIMIR et DU PRÉ[3] ont montré que dans ces conditions, on peut considérer les spins comme en équilibre thermique entre eux à une «température de spin» qui peut différer de celle du réseau. Le réseau de son côté est considéré comme un réservoir thermique ayant une température déterminée.

A partir de ces hypothèses une théorie phénoménologique de la relaxation paramagnétique a été développée qui considère l'ensemble des spins d'une part, l'ensemble des degrés de liberté du réseau d'autre part comme deux systèmes qui sont chacun en équilibre interne et qui échangent mutuellement de l'énergie par les mécanismes *a* et *b*. Les conséquences qu'on en tire sont en accord avec l'expérience à des températures où les mécanismes *b* sont prédominants. Mais à la température de l'hélium liquide les prévisions théoriques sont en contradiction avec l'expérience, surtout en ce qui concerne le sens de variation du temps de relaxation τ_1, en fonction du champ magnétique H[4]. VAN VLECK[5] a montré qu'il faut tenir compte d'une part des mécanismes d'échange entre le réseau, dont la capacité calorifique est très faible à basse température, et le bain d'hélium liquide qui constitue le véritable thermostat, et que d'autre part on n'a pas le droit de considérer le réseau comme une entité en équilibre thermique. Les quanta d'énergie $W = h N$ émis par les spins grâce au mécanisme direct *a* créent dans le réseau des vibrations élastiques de fréquence déterminée N et l'excès d'énergie de ces vibrations se transmet à l'ensemble des degrés de liberté du réseau par le jeu de l'amortissement des ondes élastiques. Si le temps de relaxation τ_3 qui caractérise cet amortissement ($\tau_3 = {}^1/_2 N \delta$, δ décrément logarithmique) est plus grand que le temps de relaxation τ_1 spin-réseau, le «goulot de la bouteille» qui règle l'écoulement de l'énergie des spins vers le milieu ambiant se trouve non pas entre spins et réseau, mais entre vibrations monochromatiques du réseau de fréquence N et autres degrés de liberté du réseau. VAN VLECK a étudié les mécanismes d'amortissement des ondes élastiques, liées essentiellement aux couplages d'anharmonicité, et il a montré qu'à basse température les temps τ_3 deviennent grands. Une analyse récente de ces mécanismes d'amortissement faite par HERPIN[1] aboutit à des conclusions analogues. Ces affinements théoriques n'ont pas encore permis d'expliquer le désaccord qui subsiste entre la théorie et l'expérience. Mais on peut prévoir que l'élévation de la température de spin, soit par la relaxation non résonnante soit par la résonance magnétique, entraîne une élévation sélective du niveau d'énergie des vibrations élastiques dans un intervalle de fréquence entourant la fréquence de Larmor des spins. Autrement dit, les mécanismes électromagnétiques qui élèvent la température de spin jouent le rôle de générateurs d'ondes ultra-sonores monochromatiques dans le cristal. Cette exaltation sélective des ondes élastiques deviendra surtout importante à basse température où les mécanismes *a* sont prédominants. Mais même à des températures plus élevées où le temps de relaxation spin-réseau est conditionné surtout par les mécanismes *b*, les mécanismes *a* jouent encore un rôle et si le temps de relaxation qui leur correspond est plus court que τ_3 le niveau énergétique des ondes élastiques, dans un intervalle de fréquence déterminée, peut devenir notablement plus élevé que celui correspondant à l'énergie moyenne thermique du réseau.

Dans le cas de la résonance nucléaire, l'énergie des ondes ainsi créée reste très faible à cause de la grande valeur du temps τ_1 et de la faible énergie des quanta correspondants. Mais dans le cas de la résonance électronique dans le domaine des hyperfréquences (3000 à 30000 mc/sec) les quanta d'énergie sont élevés et les temps de relaxation τ_1 sont courts. *La résonance magnétique électronique peut constituer une technique génératrice intéressante d'ondes hypersonores de fréquence élevée.* Les propriétés directives et de polarisation de ces ondes doivent dépendre des conditions de symétrie de leur formation (orientation des axes cristallins et des champs magnétiques fixes et oscillants).

La bande de fréquence des ondes élastiques ainsi créée est relativement large, d'une part parce qu'elle est conditionnée par la largeur de la bande de résonance magnétique due aux échanges spin-spin et d'autre part parce que la durée de vie des phonons est fortement réduite par les échanges d'énergie avec les spins (les mécanismes d'échange jouant dans les deux sens) et que cela entraîne, en vertu du principe d'incertitude, un élargissement de l'intervalle de fréquence (VAN

[1] C. J. GORTER, *Paramagnetic Relaxation* (Elsevier, Amsterdam, 1947). – A. H. COOKE, Reports Progress Physics *13*, 276 (1950).

[2] H. B. G. CASIMIR et F. K. DU PRÉ, Physica *5*, 507 (1938); *6*, 156 (1939).

[3] H. B. G. CASIMIR et F. K. DU PRÉ, Physica *5*, 507 (1938); *6*, 156 (1939).

[4] R. J. BENZIE et A. H. COOKE, Proc. Phys. Soc. [A] *63*, 201 (1950). – H. C. KRAMERS, D. BIJL et C. J. GORTER, Physica *16*, 65 (1950).

[5] J. H. VAN VLECK, Phys. Rev. *59*, 724, 730 (1941). – A. HERPIN, Thèse, Paris 1950 (à paraître dans Ann. Physique).

[1] A. HERPIN, Thèse, Paris 1950 (à paraître dans Ann. Physique)

VLECK[1]). Ces deux effets d'élargissement sont proportionnels à la concentration des ions paramagnétiques dans le cristal. Seul dans un cristal magnétiquement dilué, où cette concentration est faible, la génération d'ondes hypersonores restera limitée à une bande de fréquence étroite.

Détection des ondes hypersonores. Ces ondes hypersonores de fréquence déterminée excitées dans un cristal peuvent être détectées par l'étude de la diffusion de la lumière par le cristal. La diffusion Rayleigh d'un cristal est due d'une part à la diffusion par les imperfections de structure, indépendante de la température et de fréquence non modifiée, d'autre part à la diffusion par les ondes thermoélastiques donnant des doublets Brillouin d'après la relation:

$$\pm \frac{\Delta\nu}{\nu} = \frac{N}{\nu} = 2\frac{V}{C}\sin\frac{\Theta}{2} \qquad (2)$$

où ν est la fréquence de la lumière, N celle de l'onde élastique, V et C les vitesses du son et de la lumière dans le cristal, Θ l'angle de diffusion. L'intensité de la diffusion occasionnée par les ondes thermoélastiques naturelles est faible et varie proportionnellement à la température absolue[2]. L'exaltation, dans le cristal, d'ondes élastiques de fréquence déterminée N donne lieu à une diffusion sélective, renforcée, dans les directions θ données par la relation (2). On sait qu'un cristal, siège d'une vibration ultra-sonore et éclairé par un faisceau lumineux, fournit un «diagramme de diffusion» de SCHAEFER-BERGMANN[3] qui correspond à de petits angles θ et qui met en évidence l'anisotropie élastique du cristal (variation de V avec l'azimut de diffusion). Un cristal, soumis à la résonance magnétique électronique et qui devient le siège d'ondes hypersonores de fréquence élevée doit fournir un diagramme de diffusion analogue sous des angles θ plus grands. Pour détecter ces ondes il y a intérêt à étudier la diffusion d'un faisceau de lumière monochromatique par le cristal, celui-ci se trouvant à basse température pour réduire l'importance des mécanismes b par rapport aux mécanismes a et pour diminuer la diffusion Rayleigh-Brillouin naturelle. L'emploi d'un filtre de résonance permet d'éliminer la diffusion par les imperfections de structure du cristal[4]. Cette étude optique exige, évidemment, qu'on perce des fenêtres transparentes dans les parois de la cavité résonnante contenant le cristal.

III

Sur les effets d'anisotropie et de cohérence liés à la résonance nucléaire quadrupolaire dans le champ électrique de la liaison chimique

A côté des phénomènes de résonance nucléaire paramagnétique qui révèlent les transitions entre les niveaux quantifiés d'orientation nucléaire dans un champ magnétique extérieur[1], il existe, dans le domaine des ondes hertziennes, des phénomènes de résonance nucléaire naturelle qui ont lieu en l'absence d'un champ extérieur constant. Ces résonances, prévues par l'étude de la structure fine des raies de rotation moléculaire dans le domaine des hyperfréquences[2], ont été recherchées par POUND[3] et mises en évidence récemment par DEHMELT et KRUGER[4]. Elles correspondent à des transitions entre niveaux quantifiés, séparés énergétiquement grâce à l'influence du gradient du champ électrique de la liaison chimique sur le moment quadrupolaire des noyaux. On peut considérer ces séparations énergétiques comme une sorte d'effet Stark intramoléculaire qui ressemble – à l'ordre de grandeur près – à la décomposition des niveaux électroniques d'un ion paramagnétique par un champ électrique cristallin[5]. Les règles qui régissent les décompositions des niveaux électroniques dans le champ cristallin peuvent se transposer dans une certaine mesure aux niveaux nucléaires dégénérés en l'absence de champ magnétique. Le degré de cessation de dégénérescence est déterminé par les règles de Bethe en fonction de la symétrie du champ interne et on peut appliquer en particulier la règle de Kramers (double dégénérescence des niveaux nucléaires lorsque i est impair). Les relations qui régissent l'action simultanée d'un champ électrique interne et d'un champ magnétique d'orientation variable sont analogues dans les deux cas. Ainsi, les relations établies pour l'ion Cr^{+++} ($s = {}^3/_2$) peuvent se transposer aux noyaux Cl ou Cu ($i = {}^3/_2$), etc.[6].

Dans un champ de symétrie cylindrique, symétrie qui est celle de la liaison chimique en première approximation (les liaisons voisines et le champ cristallin créent des perturbations de symétrie inférieure), les règles de sélection et de polarisation sont les mêmes que dans l'effet Stark: Si le nombre quantique m désigne la projection du spin nucléaire i sur la direction du champ interne, il y a coïncidence entre les niveaux $+m$ et $-m$, l'intervalle de séparation entre les niveaux $\pm m$ et $\pm(m+1)$ est proportionnel à $2m+1$ et les transitions spectrales, de caractère dipolaire magnétique, obéissent à la règle de sélection et de polarisation $\Delta m = \pm 1$ qui correspond à l'absorption de l'énergie d'un champ magnétique de haute fréquence formé de

[1] J. H. VAN VLECK, Phys. Rev. *59*, 724, 730 (1941).

[2] A. ROUSSET, *La diffusion de la lumière par les molécules rigides*, chapitre II (Gauthiers-Villars, Paris, 1946). – K. W. F. KOHLRAUSCH, *Der Smekal-Raman-Effekt*, Vol. I, p. 282 (Editions Springer, 1931).

[3] L. BERGMANN, *Der Ultraschall*, chap. IV (1942).

[4] F. RASETTI, Z. Physik *61*, 598 (1930). – R. S. KRISHNAN et V. CHANDRASEKHARAN, Ind. Acad. Sci. *31*, 427 (1950).

[1] F. BLOCH, Phys. Rev. *70*, 460 (1946). – M. SOUTIF, J. Physique *10*, 61 D (1949).

[2] R. FREYMANN, J. Physique *9* 37 [D] (1948). – J. C. PECKER, J. Physique *12*, 628 (1951). – W. MAIER, Z. Elektrochemie *54*, 521 (1950) et Ergebnisse exakter Naturwissenschaften *24*, 275 (1951).

[3] R. V. POUND, Phys. Rev. *79*, 685 (1950).

[4] H. G. DEHMELT et H. KRUGER, Naturwissenschaften *37*, 111, 398 (1950). – H. KOPFERMANN, Physica *17*, 386 (1951). – R. LIVINGSTON, Phys. Rev. *82*, 289 (1951). – H. G. DEHMELT et H. KRUGER, Z. f. Physik *129*, 401 (1951); *130*, 385 (1951). – H. G. DEHMELT, Z. f. Physik *130*, 356 (1951); H. KRUGER, ib. *130*, 371 (1951).

[5] J. J. VAN VLECK, *The theory of Electric and Magnetic Susceptibilities*, chap. XI, p. 73 (Oxford United Press, 1932). – J. C. GORTER, *Paramagnetic Relaxation* (Elsevier, Amsterdam 1947).

[6] L. J. F. BROER, Physica *9*, 547 (1942). – P. R. WEISS *et al.*, Phys. Rev. *73*, 470; *74*, 1478 (1948).

deux vibrations circulaires inverses contenues dans le plan perpendiculaire à l'axe de la liaison chimique. Comme dans l'effet Stark en optique, les deux transitions $\Delta m = -1$ et $\Delta m = +1$ de même fréquence, doivent être cohérentes lorsqu'elles sont excitées par une même vibration excitatrice rectiligne. Cette cohérence, exigée pour des raisons théoriques par PAULI[1], a été vérifiée expérimentalement dans le domaine optique par SUPPE[2]. Si les transitions d'émission spontanée du domaine optique se révèlent cohérentes, il faut admettre cette cohérence également pour les transitions d'émission induite du domaine hertzien, car les arguments en sa faveur ont ici encore plus de poids.

Dans les monocristaux où les liaisons sont orientées dans des directions fixes, la règle de polarisation entraîne des effets d'anisotropie dont l'étude fournira (concurremment avec l'analyse de la structure aux rayons X, avec celle du dichroïsme d'absorption infrarouge et avec la détermination du tenseur de polarisation des raies Raman) une nouvelle méthode pour déterminer l'orientation des liaisons chimiques dans les milieux ordonnés et pour suivre l'apparition du désordre sous forme d'oscillation de rotation d'abord, de franchissement de seuils de potentiel ensuite[3] lorsque la température augmente. Enfin, les indications que donne cette étude sur le gradient du champ électrique interne à l'emplacement du noyau ont un grand intérêt pour la théorie de la liaison chimique[4].

Considérons le schéma simple d'un cristal où toutes les liaisons identiques A–B contenant le noyau à examiner A sont parallèles à une même direction liée aux axes cristallins. Désignons par Z cette direction dans le cristal et par X et Y deux directions du cristal formant avec Z un trièdre trirectangle. On prévoit, dans ce cas, les effets d'anisotropie suivants:

1° *Anisotropie d'absorption.* On suppose qu'on étudie la résonance par sa répercussion sur la bobine inductrice qui crée un champ magnétique rectiligne oscillant $H_1 \cos \omega t$ suivant son axe. L'axe de cette bobine est supposé perpendiculaire à la direction X du cristal. Lorsqu'on fait tourner le monocristal dans la bobine autour de X, l'intensité d'absorption doit suivre la loi de Malus, être maximum lorsque Y est parallèle à l'axe de la bobine et s'annuler lorsque Z est parallèle à l'axe de la bobine car seule la projection de H_1 sur le plan perpendiculaire à la liaison A–B est efficace.

2° *Biréfringence nucléaire.* L'anisotropie d'absorption entraîne une biréfringence d'origine nucléaire dans le domaine des radiofréquences qu'on peut mettre en évidence en utilisant, selon la méthode de BLOCH[1], une bobine détectrice indépendante de la bobine inductrice et à angle droit de celle-ci. Supposons les axes des deux bobines orthogonales tous deux dans le plan YOZ, et tournons le cristal autour de X. L'effet d'induction sur la deuxième bobine sera nul lorsque les axes des bobines seront l'un suivant Y, l'autre suivant Z, il sera maximum lorsque ces axes seront orientés à 45°, c'est-à-dire suivant les bissectrices des axes Y et Z. Le signal induit variera comme $\sin 2\alpha$, α étant l'angle entre Z et l'axe de l'une des bobines.

3° *Cohérence des deux transitions circulaires inverses* $\Delta m = +1$ *et* $\Delta m = -1$. Le postulat de cohérence permet d'affirmer et la théorie macroscopique de l'induction magnétique nucléaire[1] confirme que les deux transitions circulaires inverses $\Delta m = +1$ et $\Delta m = -1$ qui ont même fréquence en l'absence de champ magnétique, présentent une relation de phase définie par rapport au champ inducteur. Elles sont donc entre elles en accord de phase si elles dérivent d'une même vibration inductrice rectiligne et, par conséquent, le moment induit résultant est rectiligne et parallèle au champ inducteur $H_1 \cos \omega t$. Lorsque les deux bobines inductrice et détectrice sont orthogonales l'une à l'autre et ont toutes deux leurs axes perpendiculaires à Z aucune induction ne doit se produire dans la bobine détectrice. L'application d'un champ magnétique H_0 croissant, parallèle à Z, dissocie les transitions $\Delta m = +1$ et $\Delta m = -1$ et supprime leur cohérence. Elle fait naître un signal dans la bobine détectrice. Ce dispositif est la transposition, dans le domaine des radiofréquences, de l'expérience de dépolarisation d'une radiation de résonance optique par un champ magnétique dirigé vers l'observateur[2]. Mais le cas radio se distingue du cas optique par la possibilité d'utiliser des bandes d'émission et de réception plus étroites que la largeur des bandes étudiées, et au lieu d'une croissance du signal vers un palier on doit observer un signal passant par un maximum pour un champ de l'ordre de $H_0 = 1/|\gamma|\,\tau$, γ étant le rapport gyromagnétique et τ le temps de relaxation spin-spin (voir appendice). Ainsi qu'en optique, une telle étude donnera des indications sur les durées de vie des niveaux intéressés, déterminées ici par les mécanismes de relaxation. Cette méthode qui ne nécessite que des champs magnétiques faibles réalisables avec des bobines sans fer, permettra de déterminer la «largeur vraie» des bandes de résonance, non affectée par la non-uniformité du champ. Toutefois, pour les très grandes durées de relaxation (pour $\tau = 1$ sec, les champs critiques sont de l'ordre de 10^{-3} œrsted), la compensation du champ terrestre et de ses variations peut poser un problème expérimental difficile. Mais l'existence d'un moment

[1] W. PAULI, Handb. Physik, Vol. 23, Quantentheorie, Ziffer 18, voir aussi: P. SOLEILLET, J. Physique *7*, 77, 118, 173 (1936).

[2] F. SUPPE, Z. Physik *113*, 18 (1939). – P. PRINGSHEIM, *Fluorescence and Phosphorescence* p. 98 (1949).

[3] A. KASTLER et A. ROUSSET, Phys. Rev. *71*, 455 (1947). – A. KASTLER, Z. Elektrochemie *54*, 501 (1950). – E. R. ANDREW, J. Chem. Phys. *18*, 607 (1950).

[4] C. H. TOWNES et B. P. DAILEY, J. Chem. Physics *17*, 789 (1949).

[1] F. BLOCH, Phys. Rev. *70*, 460 (1946). – M. SOUTIF, J. Physique *10*, 61 [D] (1949).

[2] P. PRINGSHEIM, *Fluorescence and Phosphorescence*, p. 79 (Interscience Publ., New-York 1949). – A. C. G. MITCHELL et M. W. ZEMANSKY, *Resonance Radiation and Excited Atoms*, chap. 5 (Cambridge United Press 1934).

électrique quadrupolaire détermine, grâce au couplage électrique des noyaux, des temps de relaxation courts. Les mêmes considérations s'appliquent également aux transitions électroniques entre niveaux séparés par le champ cristallin, et qui sont dégénérés en l'absence de champ magnétique. Ici aussi une étude expérimentale de la cohérence sera intéressante.

Un exemple de cristal, où toutes les liaisons d'un type donné A–B ont même orientation, est l'iodoforme CHI_3 où l'orientation parallèle de toutes les liaisons C—H a été mise en évidence par l'étude du dichroïsme d'absorption infra-rouge[1]. Un monocristal de iodoforme deutérié doit donc permettre l'étude de l'anisotropie et de la cohérence de la résonance $m = 0 \rightleftarrows m = \pm 1$ du noyau de deutérium dans la liaison C–D dont la fréquence doit être du domaine des centaines de kilohertz. Lorsque dans une molécule ou dans une maille cristalline des liaisons identiques sont orientées dans plusieurs directions différentes, l'effet global d'anisotropie est la superposition des effets des liaisons de différentes orientations. A cause de la cohérence entre les moments induits (cohérence qui doit exister non seulement entre les transitions $\Delta m = +1$ et $\Delta m = -1$ d'une même liaison, mais aussi entre les moments induits dans les différentes liaisons) ce sont leurs amplitudes vectorielles qui sont à ajouter. L'analyse des diagrammes angulaires permettra la détermination des angles entre les liaisons. On montre facilement que pour un édifice tétraédrique (liaisons C—Cl dans CCl_4) il y a isotropie: le moment induit est toujours parallèle au champ inducteur et de grandeur constante quelque soit l'orientation de ce champ par rapport au tétraèdre. Pour une poudre cristalline où les liaisons sont orientées au hasard, un calcul statistique montre que l'intensité du signal vaut les deux tiers du signal obtenu dans un milieu à liaisons orientées et où le champ inducteur est perpendiculaire aux liaisons.

Remarquons que l'étude de la cohérence des deux transitions $\Delta m = \pm 1$ et de sa cessation dans un champ magnétique faible ne nécessite pas l'emploi de monocristaux où les liaisons A–B du même type aient une direction unique dans le cristal. Il suffit de disposer de monocristaux où ces liaisons sont coplanaires. C'est le cas des liaisons C–X des dérivés méta- et para-dihalogénés du benzène[2] pour lesquelles la maille élémentaire contient deux molécules dont les axes C–X ont deux orientations différentes. Il convient d'orienter dans ce cas le champ inducteur H_1 normalement au plan des liaisons et le champ constant H_0 et l'axe de la bobine détectrice suivant l'une et l'autre bissectrice des liaisons.

Les premières recherches sur la résonance nucléaire quadrupolaire ont été faites sur des poudres cristallines[1]. Nous pensons avoir montré l'intérêt que peut présenter son étude expérimentale sur des monocristaux orientés. Une telle étude présente des difficultés et nécessite en particulier la préparation de monocristaux de taille suffisante (voir pour les cristaux organiques ROUSSET et LOCHET[2]). Un premier exemple d'étude de monocristal (noyau Cu dans le cuprocyanure de potassium) a fait l'objet d'une publication de BECKER et KRUGER[3].

Appendice

Théorie élémentaire de la cessation de cohérence dans un champ magnétique parallèle à la liaison chimique

a) Relation de phase entre le champ inducteur H_1 et le moment induit M_1 dans la résonance magnétique:

Dans le cas particulier du passage lent par la résonance et d'une amplitude très faible du champ inducteur H_1 les composantes u et v du moment induit M_1, l'une en phase l'autre en quadrature avec H_1, sont données par les équations de BLOCH[4]:

$$u = -\frac{|\gamma|\, H_1 \tau\, \Delta\omega}{1 + \tau^2 \Delta\omega^2} M_0, \quad v = \frac{|\gamma|\, H_1 \tau}{1 + \tau^2 \Delta\omega^2} M_0$$

où M_0 représente le moment d'équilibre dans un champ constant H_0, τ le temps de relaxation spin-spin, γ le rapport gyromagnétique et où $\Delta\omega = \omega - |\gamma|\, H_0$ est l'écart entre la fréquence du champ oscillant H_1 et la fréquence de résonance dans le champ H_0.

Le retard de phase de M_1 par rapport à H_1 est défini par

$$\operatorname{tg}\varphi = \frac{v}{u} = -\frac{1}{\tau\, \Delta\omega}$$

et le carré du moment induit devient:

$$a^2 = u^2 + v^2 = \frac{a_0^2}{1 + \tau^2 \Delta\omega^2} = a_0^2 \sin^2\varphi$$

au voisinage de la résonance.

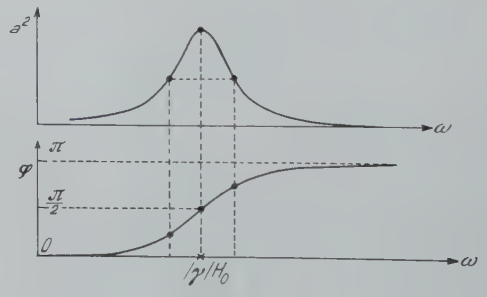


Fig. 2

La courbe de résonance en fonction de la pulsation ω à champ constant H_0 a une forme de Lorenz, la demi-largeur de la bande de résonance à mi-hauteur étant $1/\tau$ (fig. 2).

[1] YEOU-TA, C. r. Acad. Sci. *209*, 997 (1939).

[2] B. HENDRICKS, Z. Kristallographie *84*, 85 (1933). – A. ROUSSET et R. LOCHET, Journal de Physique *3*, 146 (1942). – B. D. SAKSENA, J. Chem. Phys. *18*, 1653 (1950). – B. HENDRICKS *et al.*, J. Chem. Phys. *1*, 549 (1933).

[1] H. G. DEHMELT et H. KRUGER, Naturwissenschaften *37*, 111, 398 (1950). – H. KOPFERMANN, Physica *17*, 386 (1951). – R. LIVINGSTON, Phys. Rev. *82*, 289 (1951).

[2] A. ROUSSET et R. LOCHET, J. Physique *3*, 146 (1942).

[3] G. BECKER et H. KRUGER, Naturwissenschaften *38*, 121 (1951). – Voir aussi: H. G. DEHMELT, Z. Physik *130*, 356 (1951).

[4] F. BLOCH, Phys. Rev. *70*, 460 (1946). – M. SOUTIF, J. Physique *10*, 61 [D] (1949).

Le retard de phase

$$\varphi = -\operatorname{arc\,cotg}(\tau\,\Delta\omega) \quad \text{est} \quad \varphi_m = \frac{\pi}{2}$$

à la résonance et vaut

$$\varphi_m \pm \frac{\pi}{4}$$

aux abscisses de mi-hauteur. En rapportant la phase du moment induit à la phase de résonance par le changement de variable

$$\theta = \varphi - \varphi_m$$

on peut écrire:

$$\theta = \operatorname{arc\,tg}(\tau\,\Delta\omega) \quad \text{et} \quad a^2 = a_0^2 \cos^2\theta .$$

b) Résonance quadrupolaire en présence d'un champ constant H_0. La pulsation de résonance quadrupolaire ω_L dans le champ électrique interne est, en l'absence de champ magnétique, la même pour les composantes de moment M_g et M_d tournant en sens inverse, et nous admettons que pour chacun de ces moments u et v sont donnés par des relations analogues aux précédentes, $\Delta\omega$ représentant la différence $\omega - \omega_L$.

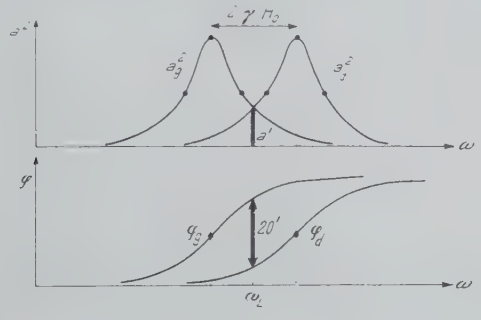


Fig. 3

En l'absence de champ H_0 les deux courbes de résonance pour le moment gauche $M_g(\Delta m = -1)$ et le moment droit $M_d(\Delta m = +1)$ coïncident et la résultante est rectiligne et parallèle au champ inducteur H_1 pour toute fréquence d'exploration ω. Si l'on applique un champ magnétique H_0 parallèle au champ électrique interne les deux courbes de résonance se séparent, les abscisses des maxima devenant respectivement (fig. 3):

$$\omega_g = \omega_L - |\gamma|\,H_0 \quad \text{pour} \quad M_g$$

et

$$\omega_d = \omega_L + |\gamma|\,H_0 \quad \text{pour} \quad M_d .$$

Les deux bandes de résonance empiètent l'une sur l'autre tant que l'intervalle de séparation $2\,|\gamma|\,H_0$ reste de l'ordre de la demi-largeur $1/\tau$. Pour une fréquence d'exploration donnée ω les deux moments induits M_g et M_d fournissent une résultante en général elliptique.

Les amplitudes des moments induits à composer se déduisent des ordonnées a_g^2 et a_d^2 des deux courbes de résonance à l'abscisse ω, et la différence de phase $\delta\theta = \theta_g - \theta_d$ est représentée par la différence de cote des deux courbes de phase à la même abscisse. Pour le cas particulier de l'abscisse ω_L (correspondant à des circuits inducteur et détecteur à bandes passantes étroites accordés sur la fréquence de résonance primitive avant l'application de H_0) nous avons $a_g^2 = a_d^2 = a_0^2 \cos^2\theta'$ avec $\theta' = \pm \operatorname{arc\,tg}\tau\,|\gamma|\,H_0$. La différence de phase entre a_g et a_d est $2\theta'$ et le moment résultant est dans ce cas un moment rectiligne d'amplitude réduite $2a' = 2a_0 \cos\theta'$ et ayant tourné par rapport au champ inducteur d'un angle

$$\frac{\varphi_g - \varphi_d}{2} = \theta'$$

vers la droite (fig. 4).

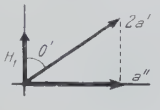


Fig. 4

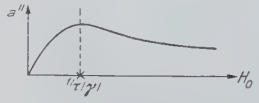


Fig. 5

La force électromotrice induite dans une bobine détectrice d'axe OB perpendiculaire à H_1 sera proportionnelle à

$$a'' = 2\,a' \sin\theta' = 2\,a_0 \sin\theta' \cos\theta' = a_0 \sin 2\,\theta' .$$

L'intensité du signal sera donc proportionnel à:

$$\sin 2\,\theta' = \frac{2 \operatorname{tg}\theta'}{1 + \operatorname{tg}^2\theta'} = \frac{2\,\tau\,|\gamma|\,H_0}{1 + \tau^2\gamma^2 H_0^2}$$

Le signal passera par un maximum pour

$$H_0 = \frac{1}{\tau\,|\gamma|} .$$

(fig. 5).

Summary

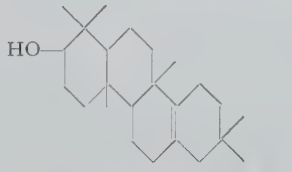
Guided by the analogies and connexions between optical spectroscopy and radiofrequency spectroscopy, the author suggests some experiments on radiofrequency resonance phenomena. In a first part, he shows that in certain cases irradiation with light will modify the intensity of radiofrequency resonance signals, and that such an effect is particularly to be expected at low temperature and with circularly polarized light. In a second part, connexions between ultrasonic waves and magnetic resonance are examined and attention is drawn to the fact that magnetic resonance in crystals at very low temperature acts as a generator of ultrasonic waves of high frequency, those waves being detectable by study of the angular distribution of light scattered by the crystal. Finally it is emphasized that investigation of nuclear quadrupole resonance in monocrystals must reveal striking anisotropy and coherence effects and that the study of destruction of coherence by small magnetic fields provides a new method for measuring spin-spin relaxation time.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

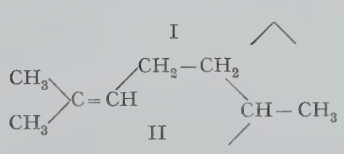
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Non-identity of Dihydroeuphol and Dihydrobasseol

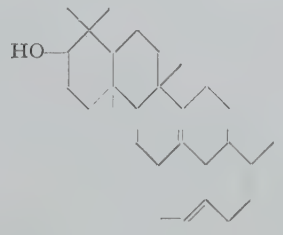
Vilkas[1] proposed formula I for euphol. However, more recently it was shown[2] that the grouping II is present in euphol and since it is impossible to incorporate II into I, a modification of Vilkas' formula is necessary. Formula III seems to explain all the known reactions of euphol and obeys the isoprene rule.



I

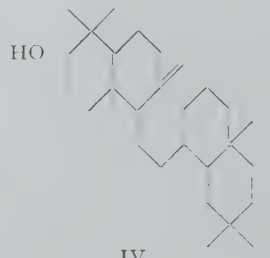


II



III

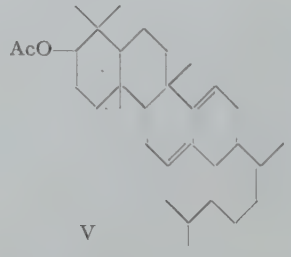
Dupond, Dulou and Vilkas[3] noticed the close similarities between the melting points and optical rotations of the derivatives of dihydroeuphol and those of dihydrobasseol and actually showed that there was no depression in the mixed melting point of the two acetates. Dihydroeuphol and dihydrobasseol were therefore assumed to be identical. However, the implications of this were great because basseol[4] cyclizes to β-amyrenol when treated with acids[5], the acetate of dihydrobasseol gives β-amyranonyl acetate on oxidation[6] and Pinto Coelho[7] has put forward formula IV as a basis for discussion of the structure of basseol. It is at once evident that if the identity of dihydroeuphol and dihydrobasseol were confirmed, not only the tentative formulae for basseol and euphol must be reinvestigated but also the well-established formula of β-amyrenol must be changed.



IV

Vilkas[1] recently provided some indirect proof against the identity of dihydrobasseol and dihydroeuphol based mainly on the fact that euphyl acetate cannot be cyclized or isomerized by acid. However, more direct proof was desirable.

It is found in the literature[2] that the oxidation with perhydrol of the acetate of dihydrobasseol gives β-amyranonyl acetate due to cyclization. For comparison dihydroeuphyl acetate was oxidized under similar conditions, namely: 475 mg of dihydroeuphyl acetate (m.p.[3] 125–126°C, $[\alpha]_D = +35{\cdot}3$ ($CHCl_3$)) were heated in the steam bath for two hours with 4·7 ml of perhydrol and 24 ml of glacial acetic acid. Upon cooling, the solution was diluted with water and the solid separated by filtration, washed, dried and crystallized once from methyl alcohol and once from acetone. Needles (65 mg) were obtained melting at 171–173°C. More needles of the same substance were obtained from the mother liquors but the rest was an uncrystallizable resin. The product obtained is the oxide of dihydroeuphyl acetate, previously obtained by Vilkas[1] and others[4] with perbenzoic acid.



V

As proof of the identity of the substance melting at 171–173°C with the oxide the opening of the epoxide ring was carried out by heating 50 mg of the former for two hours on the steam bath with 1·25 ml of glacial acetic acid containing 10% w/v of hydrobromic acid. Upon cooling and diluting with water the mixture was

[1] M. Vilkas, Ann. Chim. *6*, 325 (1951).

[2] K. Christen, O. Jeger, and L. Ruzicka, Helv. chim. acta *34*, 1675 (1951).

[3] G. Dupont, R. Dulou, and M. Vilkas, Bull. soc. chim. France *16*, 809 (1949).

[4] I. M. Heilbron, G. L. Moffet, and F. S. Spring, J. Chem. Soc., *1934*, 1583.

[5] J. H. Beynon, I. M. Heilbron, F. S. Spring, ib., 989 (1937).

[6] C. W. Picard, K. S. Sharples, and F. S. Spring, Chem. and Ind. *58*, 58 (1939). – F. Pinto Coelho, Rev. faculdade Ciên. Univ. Coimbra *18*, 71 (1949).

[7] F. Pinto Coelho, Rev. faculdade Ciên. Univ. Coimbra *18*, 71 (1949).

[1] M. Vilkas, Ann. Chim. *6*, 325 (1951).

[2] F. Pinto Coelho, Rev. faculdade Ciên, Univ. Coimbra *18*, 71 (1949).

[3] All melting points are uncorrected.

[4] A. G. Gonzalez, A. Calero, and A. H. Toste, Anales fís. y quím. Madrid [B] *47*, 287 (1951).

extracted six times with petroleum ether (b.p. 40–60°) and the latter after washing and drying was passed through a column of 7 gm of alumina (BROCKMANN activity I). Washing of the column with 100 ml of petroleum ether afforded 27 mg of a substance that melted at 107–109° C after one crystallization from absolute ethyl alcohol. This is the diene V formed by splitting off two moles of water from the glycol formed and had already been isolated by opening the oxide of dihydroeuphyl acetate with hydrochloric acid[1]. In fact the substance melting at 107–109°C has a maximum in the ultraviolet absorption spectrum at 240 mμ (log $\varepsilon = 4{\cdot}21$).

The euphol used here was isolated some four years ago from the latex of "cardon" (*Euphorbia canariensis* L., from the forest district of Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands) following the chromatographic method of NEWBOLD and SPRING[2]. It was found that only if the alumina had a Brockmann activity III would the separation take place as described by the English authors.

F. A. ALVES

Centro de Estudos de Química, Laboratório Químico, Universidade de Coimbra, Portugal, September 4, 1951.

Résumé

Les dérivés dihydrogénés de l'euphole et du basséole ne sont pas identiques. Contrairement à l'acétate de dihydrobasséole qui, par oxydation avec de l'eau oxygénée, donne l'acétate de β-amyranonyle, comme l'a montré PINTO COELHO[3], l'acétate de dihydroeuphyle est transformé par le même réactif en époxyde d'acétate de dihydroeuphyle.

[1] M. VILKAS, Ann. Chim. *6*, 325 (1951).
[2] G. T. NEWBOLD and F. S. SPRING, J. Chem. Soc. *1944*, 248.
[3] F. PINTO COELHO, Rev. faculdade Ciên. Univ. Coimbra *18*, 71, (1949).

Innervation de la bandelette sillonnée (limbus laminæ spiralis chez le chat

La bandelette sillonnée est un épaississement fibreux participant, dans l'oreille interne, à la constitution de l'organe de Corti, qu'elle suit tout le long des tours de spire de la cochlée. Elle repose sur la lame spirale osseuse, en dedans des cellules sensorielles. Sur elle s'insère la membrana tectoria qui flotte dans le liquide endolymphatique, immédiatement au-dessus des cils des cellules nobles. Elle est en rapport, par sa base, avec les faisceaux de fibres auditives venues du ganglion de Corti, situé plus en dedans par rapport à l'axe de la columelle.

Grâce à la technique de fixation et d'imprégnation à l'argent réduit de WEBER[1], une innervation jusque là, semble-t-il, inconnue, fut mise en évidence dans cet organe, chez le chat. Les coupes sériées, perpendiculaires à l'axe de la columelle, avec une épaisseur de 10 μ, montrent les faits suivants: Des fibres se détachent des faisceaux sensoriels et cheminent isolément vers la base de la bandelette sillonnée, où elles pénètrent plus ou moins profondément. Très peu nombreuses dans le premier tour de spire, elles se rencontrent plus volontiers dans le second et surtout dans le troisième. Comme les fibres auditives des faisceaux dont elles se détachent, elles présentent les caractères morphologiques habituels aux fibres sensorielles ou sensitives, qui sont d'être assez épaisses et noires. Leur origine semble variable, soit que l'on ait affaire à la collatérale d'une fibre sensorielle, située parfois un peu à l'écart du faisceau correspondant, ou bien à l'unique terminaison d'un dendrite d'une cellule appartenant au ganglion spiral. Ces fibres se bifurquent souvent, se dirigeant suivant des sens très variables dans la bandelette, où elles se terminent en des points plus ou moins éloignés du faisceau nerveux d'origine, parfois le long de capillaires sanguins, par un petit renflement, le bouton terminal de CAJAL, prolongé par un filament extraordinairement fin, l'appareil métaterminal de WEBER.

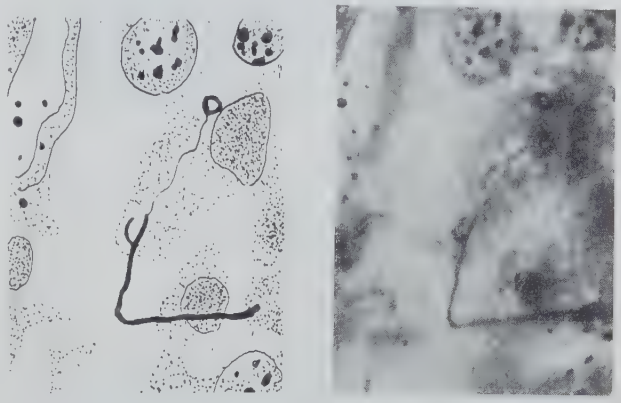


Fig. 1. – Terminaison d'une fibre sensorielle de la bandellette sillonnée. L'appareil métaterminal est en pleine évolution cyclique et se termine par une sphérule un peu triangulaire et aux parois épaisses. Microphoto. Im. Leitz Apochno. Gross. 2500 ×.

Cette fibrille ténue est le siège de remaniements physiologiques constants, qui se traduisent par des aspects très divers. Parfois le filament métaterminal est bien coloré et se termine par un grain minuscule, au contact d'un noyau; sa longueur est d'environ de 10 à 20 μ. Le granule terminal se gonfle souvent, tandis que le mince filament qui le supporte est moins coloré et même granuleux en son milieu, ce qui est la marque d'un début de dégénérescence. D'autres appareils montrent une terminaison en anneau extrêmement fin, à la limite de la visibilité permise par les meilleurs systèmes optiques, ou bien à paroi épaisse, témoin d'une désintégration plus avancée; cet anneau ordinairement circulaire est parfois anguleux et triangulaire. En d'autres points, le filament métaterminal est complètement désintégré, sa place n'étant plus marquée que par une série de corpuscules argentaffines, plus ou moins volumineux. Souvent la régénération qui suit ce stade, se fait à côté de l'emplacement primitif, de sorte que l'on peut voir, au bout d'une fibre, un appareil métaterminal sain à côté de figures de dégénérescence en direction légèrement divergente. Tous ces aspects correspondent au cycle de désintégration, observé par WEBER[1] et dont la période semble d'autant plus rapide que la synapse est plus active; ce phénomène fut déjà décrit dans de nombreux organes: surrénale, moelle épinière[2], duremère[3], synapses neuro-musculaires (BAUMANN[4]), terminaisons sensitives du muscle du marteau (PORTMANN[5]), ganglions autonomes cardiaques (TCHENG[6]).

[1] A. WEBER, Bull. Histol. appl. *20*, 49 (1943).
[1] A. WEBER, Bull. Histol. appl. *27*, 163 (1950).
[2] A. WEBER, Bull. Histol. appl. *27*, 73 (1950).
[3] A. WEBER, Exper. *4*, 394 (1948).
[4] J. A. BAUMANN, C. r. Assoc. Anat., Nancy, *38*, (1951, sous presse).
[5] M. PORTMANN, Rev. Laryng. *70*, 534 (1949).
[6] K. T. TCHENG, Acta ant. *11*, 431 (1951).

Enfin, quelques terminaisons de fibres végétatives, colorées en brun clair et extrêmement fines, s'observent le long de petites artérioles dans le voisinage de la bandelette sillonnée.

Fig. 2. – Terminaisons sensorielles dans la bandelette sillonnée à différents stades du cycle physiologique de Weber.
1 Appareil métaterminal bien constitué, terminé par un petit granule.
2 Début du cycle: le granule s'hypertrophie.
3 L'appareil est terminé par une sphérule triangulaire.
4 Dégénérescence avancée, particulièrement au milieu du parcours de l'appareil métaterminal (au niveau du gros noyau sur notre dessin). La terminaison montre un aspect volumineux.
5 Dégénérescence complète: dépôts argentiques, restes d'un appareil antérieur qui s'est reconstitué depuis dans un axe différent.
(Dessins à la chambre claire, gross. 3000 ×, réduction photographique 1/3.)

Bien que la provenance et la morphologie de ces fibres ne laissent aucun doute sur leur nature nerveuse, elle a été vérifiée pour certaines d'entre elles, après imprégnation argentique par la méthode de Weber, grâce à la mise en évidence de leur dichroïsme en lumière polarisée, propriété due à leur ultra-structure, qui les distingue des fibres collagènes ou de réticuline (Baud[1]). Ces éléments nerveux peuvent être comparés aux appareils sensitifs décrits récemment par Palumbi[2], autour des taches vestibulaires.

En somme, il existe dans la bandelette sillonnée du chat des fibres nerveuses d'aspect sensitif et dont les origines paraissent être les cellules du ganglion de Corti. Quelques uns de ces éléments semblent de simples collatérales de fibres sensorielles, disposition assez curieuse, déjà rencontrée par Cajal[3], le long de la bandelette optique du chat adulte et par Berthoud[4], le long des fibres optiques de l'embryon de poulet.

Les appareils métaterminaux des différentes fibres que nous avons ainsi observées, montrent des images très nombreuses de désintégration cyclique, analogues à celles qu'a décrites Weber dans les zones de grande activité nerveuse, ce qui indiquerait l'importance de leur rôle; mais l'on ne peut dire si elles agissent spécialement dans l'acte de l'audition, si elles correspondent à la part importante que certains physiologistes modernes confèrent au limbus spiralis dans l'enchaînement des phénomènes électro-acoustiques (Leiri[5]), si elles interviennent dans le maintien de la pression endolymphatique, comme point de départ de réflexes vasomoteurs et sécrétoires, ou si elles ne sont que les simples agents de la sensibilité générale de l'organe.

M. Portmann et Mme C. Portmann

Laboratoires de neuro-histologie de l'Université de Genève et d'audiologie de l'Université de Bordeaux, le 8 octobre 1951.

Summary

The limbus laminae spiralis of the inner ear, to which the membrana tectoria of the Corti apparatus is attached, seems in general to be a simple supporting structure. In the cat, this region is richly innervated with fibres coming from the spiral ganglion. The endings of these fibres show the cyclic changes which are characteristic for very active nerve elements.

[1] Ch. A. Baud, Acta anat. *4*, 44 (1947).
[2] G. Palumbi, Collegium ORRAS, Rome, publié dans Rev. Laryng., suppl. mai 1951.
[3] S. R. y Cajal, *Histologie du Système nerveux de l'homme et des vertébrés*, vol. *2*.
[4] E. Berthoud, Rev. suisse Zool. *50*, 473 (1943).
[5] F. Leiri, Acta Oto-Laryng. *37*, 1 (1949).

Particularités morphologiques des corpora allata chez les Leptophlebiidæ (Ephemeroptera)

Découverts par Nabert[1] chez *Cloeon dipterum*, les corpora allata des Ephéméroptères ont été décrits en détail par Hanström[2] chez *Cloeon* sp., *Heptagenia* sp. et *Ephemera vulgata* L. Pflügfelder[3] apporte quelques précisions sur leur anatomie microscopique et Cazal[4] confirme les données des auteurs précédents chez *Ephemera vulgata* et chez *Cloeon* sp. Nous-mêmes[5] avons appliqué quelques techniques cytologiques et histochimiques à l'étude des formations endocrines rétrocérébrales chez cinq espèces d'Ecdyonuridae.

Tous ces travaux concordent pour attribuer aux corpora allata des Ephéméroptères une structure très voisine de celle que présente le tissu lymphoïde des Vertébrés. En effet, chez toutes les espèces étudiées jusqu'à ce jour, ces organes sont représentés par des massifs cellulaires pleins, aux contours irrégulièrement polycycliques et les cellules sont dotées d'un noyau relativement volumineux, central, entouré d'un cytoplasme peu étendu. Or, l'examen histologique de quatre représentants des Leptophlebiidae, obligeamment capturés, déterminés et fixés à notre intention par T. T. Macan (Ambleside, Angleterre) nous a montré une conformation très particulière des corpora allata, dont l'intérêt nous semble justifier la description ci-dessous.

Les corpora allata se présentent, chez les quatre espèces de Leptophlebiidae que nous avons pu étudier (*Leptophlebia marginata* L, *Leptophlebia vespertina* L, *Paraleptophlebia submarginata* Steph., *Habrophlebia fusca* Curt.) sous la forme de masses oblongues, irrégulières, paires, situées ventralement par rapport au tube digestif et sur un plan transversal passant par le ganglion sous-œsophagien (fig. 1 et 2). La position de ces formations, au voisinage immédiat du tentorium et leur innervation par un nerf venu du ganglion sous-œsophagien rendent l'identification absolument certaine et cet emplacement est conforme à celui qui a été décrit chez les autres Ephéméroptères.

Chaque corpus allatum est entouré d'une mince capsule conjonctive, qui retient le vert lumière et le bleu d'aniline. Sur cette basale s'appuient des cellules cylindriques, hautes de 15 μ en moyenne, dont l'ensemble forme un épithélium qui délimite une cavité (fig. 2, 3

[1] A. Nabert, Z. wiss. Zool. *104*, 181 (1913).
[2] B. Hanström, Kungl. Svensk. Venenskapsakad. Handl. *III/18*, n° 8, 1 (1940).
[3] O. Pflügfelder, Biol. Zbl. *66*, 211 (1947).
[4] P. Cazal, Bull. biol. France Belgique, Suppl. 32, 1 (1948).
[5] L. Arvy et M. Gabe, Bull. Soc. zool. France *75*, 267 (1950).

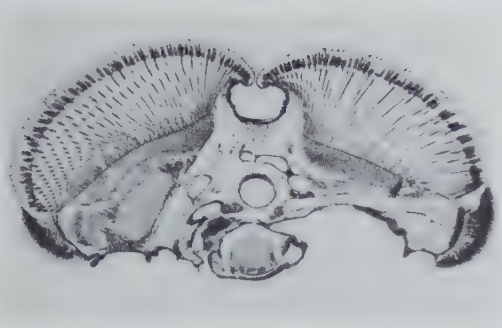


Fig. 1. – Coupe transversale de la tête chez l'imago ♂ de *Leptophlebia vespertina*. Carnoy, triple coloration de Prenant, 35 diamètres. Remarquer les corpora allata, situés au-dessus du tentorium, au contact de grosses trachées et au-dessous de l'œsophage.

ét 4). Les noyaux occupent une position basale ou centrale; régulièrement arrondis, ils sont assez pauvres en chromatine et possèdent des nucléoles très petits. Le cytoplasme de ces cellules est pauvre en ribonucléines; on y trouve une quantité appréciable de glycogène et de rares granulations acidophiles. La lumière du tube que forme l'épithélium est occupée par des concrétions régulièrement arrondies chez certains individus, irrégulièrement bosselées chez d'autres. Ces masses qui, dans certains cas, remplissent entièrement la lumière du tube, se colorent intensément par tous les colorants acides et sont conservées par les fixateurs à base d'alcool et d'acide acétique. Les sphérules de petite taille paraissent homogènes. Les masses plus volumineuses comportent une région centrale, éosinophile, entourée d'une mince enveloppe cyanophile et Hotchkiss-positive.

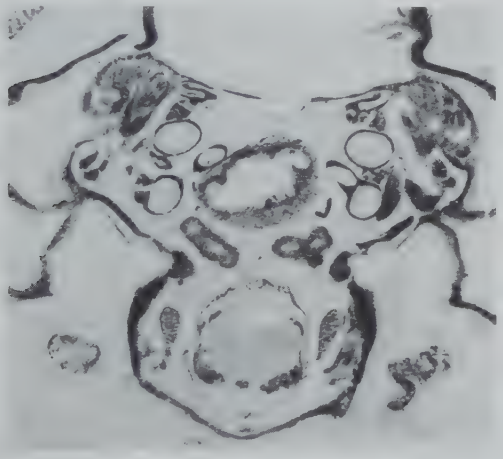


Fig. 2. – Coupe transversale de la tête chez le subimago ♂ de *Leptophlebia vespertina*. Même technique que figure 1. 200 diamètres. Remarquer la cavité creusée au centre des corpora allata, située entre le ganglion sous-œsophagien et l'œsophage, de part et d'autre de la ligne médiane – – –.

La comparaison d'individus fixés aux divers stades du développement post-embryonnaire (nymphes âgées, subimago et imago des deux sexes) fait ressortir des différences de structure, concernant aussi bien l'épithélium que les masses contenues dans la lumière du tube. Chez les nymphes (fig. 3), les noyaux sont généralement basaux; le cytoplasme est parsemé de zones claires après emploi des colorations topographiques et les méthodes histochimiques démontrent qu'il s'agit de glycogène. Chez le subimago (fig. 4), on trouve des cellules plus pauvres en glycogène, à noyau plus proche du

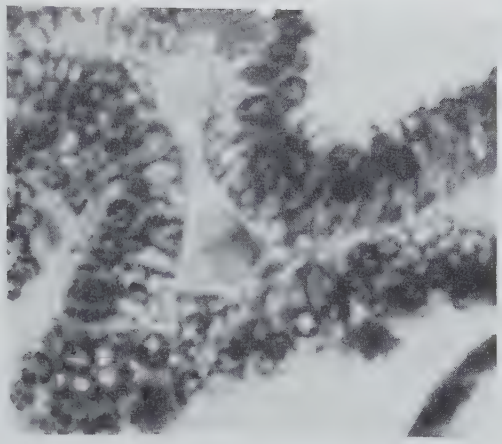


Fig. 3. – Détail d'un corpus allatum chez la larve de *Leptophlebia vespertina*. Même technique que figure 1. 1200 diamètres. Remarquer les zones claires dans le cytoplasme des cellules du corpus allatum, (correspondant à des enclaves de glycogène), ainsi que les concrétions arrondies dans la lumière.

centre de la cellule. Les concrétions s'agglomèrent en amas mûriformes, entourés d'une mince couche cyanophile. Cette agglomération est encore plus nette chez l'imago, dont les corpora allata sont faits de cellules à noyaux très petits, dépourvus de nucléoles et dont le cytoplasme ne contient plus que des traces de glycogène.

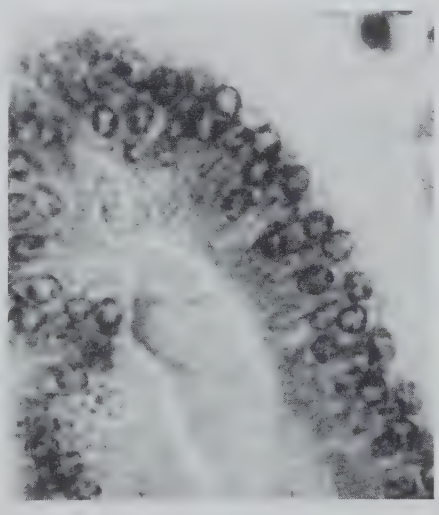


Fig. 4. – Détail du corpus allatum chez le subimago de la même espèce. Même technique et même grossissement que figure 3. Remarquer la diminution des zones claires intra-cytoplasmiques et les volumineuses concrétions centrales.

La structure des corpora allata chez les Leptophlebiidæ diffère donc notablement de celle qui a été décrite chez les autres représentants des Ephéméroptères. Il y a lieu de souligner, à cet égard, que l'existence d'une cavité au centre du corpus allatum est une éventualité rare parmi les insectes ptérygotes. Mis à part l'exemple classique que représentent les corpora allata vésiculeux des Phasmidæ (Heymons[1], Pflügfelder[2],), des corpora allata creux n'ont été signalés, à notre connaissance, que chez les Psocoptères (Badonnel[3]) et chez *Homotoma*

[1] R. Heymons, Sitz.ber. Akad. Wiss. Berlin *30*, 563 (1899).
[2] O. Pflügfelder, Z. wiss. Zool. *149*, 477 (1937).
[3] A. Badonnel, Bull. biol. France Belgique, Suppl. 18, 1 (1934).

figus (Cazal[1]). L'aspect des corpora allata des Leptophlebidæ rappelle, en beaucoup plus étendu, l'organe décrit par Chaudonneret[2] chez *Thermobia domestica* Pack. sous le nom de corps jugal et assimilé par cet auteur à un corpus allatum.

Les Leptophlebiidæ que nous avons examinées possèdent donc des corpora allata de type épithélial; cette structure est généralement considérée comme primitive et il y a lieu de rappeler que les données biogéographiques font considérer la famille des Leptophlebiidae comme étant fort ancienne (Despax[3]).

Quant aux différences que montre l'examen des individus parvenus aux divers stades du développement, elles représentent la preuve d'une fonction sécrétrice des corpora allata. Les auteurs cités au début de ce travail insistent sur l'absence de tout aspect de sécrétion chez les Ephéméroptères précédemment étudiés et nous-mêmes n'en avons pas trouvé chez les Ecdyonuridæ. Or, l'évolution des cellules des corpora allata et des concrétions centrales démontre que ces organes sont le siège, chez les Leptophlebiidæ, de phénomènes sécrétoires analogues à ceux qui ont été décrits par Pflügfelder chez *Carausius*.

Conclusion. La structure des corpora allata chez quatre représentants des Leptophlebiidæ répond à un type très primitif. En effet, ces organes sont représentés par des tubes épithéliaux creux, dont la lumière contient un produit de sécrétion acidophile. Les modifications des corpora allata au cours du développement post-embryonnaire démontrent que ces organes sont le siège, chez les Leptophlebiidæ examinées, d'un cycle sécrétoire.

Lucie Arvy et M. Gabe

Laboratoire d'anatomie et histologie comparées de la Sorbonne, Paris, le 24 août 1951.

Zusammenfassung

Bei vier Vertretern der Leptophlebiidae (*Leptophlebia vespertina* L., *Leptophlebia marginata* L., *Paraleptophlebia submarginata* Steph. und *Habrophlebia fusca* Curt.) wird eine von den anderen Ephemeroptera verschiedene und im allgemeinen bei Pterygota seltene Struktur der Corpora allata festgestellt. Diese Organe sind bei den erwähnten Eintagsfliegen epitheliale Röhren, deren Lumen eine azidophile Substanz enthält. Die Untersuchung verschiedener Stufen der postembryonalen Entwicklung lässt eine sekretorische Tätigkeit der Corpora allata vermuten.

[1] P. Cazal, Bull. biol. France Belgique, Suppl. 32, 1 (1948).
[2] J. Chaudonneret, Bull. Soc. zool. France *74*, 164 (1949).
[3] R. Despax, *Ephéméroptères* dans: Traité Zool. Paris *9*, 279 (1949).

Production of Heterozygous Diploids in Filamentous Fungi

In most filamentous fungi the nuclei are haploid throughout the life cycle except for the zygote nucleus which is usually diploid and which immediately undergoes meiosis. Undoubtedly, as an accident of nuclear division, polyploid nuclei (that is, diploid or higher in the hyphae, tetraploid or higher in the zygote) may occur as they do in other organisms. Indeed, the artificial production of polyploids has been claimed[1]. In none of these cases is there conclusive evidence of polyploidy, though in one case[1] there is some. If polyploid nuclei arise, or can be induced to arise, as rare accidents in division, the problem is how to recognise the hyphae carrying them and how to make sure that these nuclei are polyploid. These conditions have been fulfilled in the development of a technique for the production of polyploids in the homothallic *Aspergillus nidulans*. This technique has now been applied with consistent results to the production of polyploids heterozygous for known genetic markers; it can be applied, undoubtedly, to any other filamentous fungus in which heterokaryosis occurs and in which there are uninucleate vegetative cells at some stage in the life cycle.

The technique is based on the following reasoning. When heterokaryotic cells are formed between two strains, differing in two nutritional requirements and/or two morphological characters, the two types of nuclei are segregated into individual uninucleate cells (for instance the conidia in *Aspergillus nidulans*). Following plating, these conidia give origin to colonies which are of either one or the other parental type. If, however, a conidium has been formed which carries a diploid nucleus with one chromosome complement from each parent strain, a colony will arise which differs in characters from both parent strains. In most cases one can reasonably guess in which way the diploid heterozygote should differ from the parents. For instance, if one parent requires one growth factor and the other parent a different growth factor and each of these requirements is known to be genetically conditioned the diploid will probably require neither growth factor. Similarly if one parent differs from normal (green) in having yellow conidia and the other in having white conidia and the two differences are known to be determined by mutation in two different autonomous genes, the diploid (which is heterozygous for both) will probably have green conidia. The reasonable assumption in both cases is that the mutant characters—requirement versus non-requirement mutant colour versus normal colour—are recessive. The diploid will, therefore, be distinguishable from the parental types; it may also be selected out of the mass of parental types by using non-supplemented media.

An example, out of many, in which both colour of conidia and nutritional requirements were used as markers will illustrate the technique in operation. A heterokaryon between a strain requiring lysine and having yellow conidia and one requiring adenine and having white conidia was treated for 5 hours at 37° with d-camphor vapour. Conidia developed after treatment were plated on a medium lacking adenine and lysine. Out of several hundred thousand conidia only a few colonies grew and these had green conidia and, obviously, did not require either growth factor. A variant of this technique is that of treating with camphor vapour a heterokaryotic colony and letting it grow after treatment: in this case the diploid may arise as sectors of green colour in the part of the colony developed after treatment.

That the strains obtained by this technique actually carry diploid heterozygous nuclei is shown by:

(1) the phenotype of the strains;

(2) analysis of the ascospores, among which the expected recombinant types are found;

(3) the fact that all diploid heterozygotes so far produced undergo rare somatic recombination resulting

[1] R. Bauch, Naturwissenschaften *29*, 503 (1941).—E. R. Sansome, Nature *157*, 843 (1946).—E. S. Beneke and G. P. Wilson, Mycologia *42*, 519 (1950).

[1] E. R. Sansome, Trans. Brit. mycol. Soc. *32*, 305 (1949).

n further diploids homozygous for one or more of the 'markers'' and still segregating for the others[1];

(4) the diameter of the conidia which is approximately 1·3 times that of the parent (haploid) strains;

(5) verification of the number of chromosomes at meiosis[2];

(6) the fact that the diploid strains, though tending to become homozygous for any markers for which they were originally heterozygous, remain diploid on indefinite subculture by means of conidia or hyphae, but not always on subculture by means of ascospores.

Haploid strains of *Aspergillus nidulans* invariably produce eight spored asci. The above mentioned diploids show in their young perithecia a large number of zygotes in meiosis which, however, result in few mature asci. These asci, unexpectedly, have mainly sixteen spores. The extremely low viability of the ascospores from diploids has not made possible a quantitative genetical analysis of tetraploid inheritance, but it has shown that both haploid and polyploid ascospores are formed.

J. A. Roper

Department of Genetics, University of Glasgow, September 5, 1951.

Résumé

En exposant aux vapeurs de camphre un mycélium de l'*Aspergillus nidulans* hétérocaryotique pour deux types de noyaux génétiquement marqués, on a obtenu des noyaux diploïdes hétérozygotes. Il est probable que ces noyaux diploïdes sont produits par l'inclusion dans un seul noyau de deux groupes haploïdes de chromosomes-fils résultant de la division de deux noyaux de types différents. On a réalisé ainsi une sorte de caryogamie artificielle. Des souches diploïdes sont obtenues par l'isolement au micromanipulateur de conidies uninuclées diploïdes. On peut vérifier le fait que les souches sont diploïdes en observant

1° leur phénotypes;
2° le nombre de chromosomes;
3° la ségrégation et la recombinaison des gènes dans les ascospores;
4° la recombinaison somatique;
5° le diamètre des conidies.

[1] G. Pontecorvo and J. A. Roper, J. gen. Microbiol. (in the press).
[2] G. Pontecorvo (unpublished).

L'accorciamento dei cromosomi nella mitosi e nella meiosi

Osservazioni sulle cellule germinali maschili di Anacridium aegyptium L., *Orthoptera, Acrididae*

Le modificazioni morfologiche dei cromosomi nel corso della mitosi e della meiosi si possono considerare quantitativamente innanzitutto come allungamenti ed accorciamenti dei filamenti cromatici. Le osservazioni ed i dati quantitativi che si hanno sono relativamente pochi (Sparrow e collaboratori[1], Manton[2], Svärdson[3]).

Più numerose sono le interpretazioni di queste variazioni, che si basano sulla riscoperta dell'avvolgimento elicoide dei cromatidi (Fuji; Kuwada e Nakamura[1]), e sulla ipotesi strutturale, più o meno accettata, di Darlington[2], il quale ha messo in rapporto i vari stadi delle variazioni della struttura cromosomica con la comparsa e le caratteristiche della disposizione elicoidale dei cromatidi.

Poichè accanto ad osservazioni sulla composizione chimica e sulla struttura molecolare di alcuni dei componenti cromosomici, mancano invece dati quantitativi sulla morfologia dei cromosomi stessi in stadi definiti della cariocinesi, credo che i risultati, qui riferiti, delle osservazioni sul grado di accordiamento dei cromosomi nella mitosi e nella meiosi delle cellule germinali maschili di *Anacridium aegyptium* L. possano essere interessanti.

Sono stati misurati i singoli cromosomi di nuclei di spermatogoni, e di spermatociti in diverse fasi cariocinetiche su preparati per schiacciamento di follicoli testicolari di animali adulti, e colorati colla Feulgen.

I dettagli di tecnica vengono qui omessi per brevità e saranno riportati nel lavoro per esteso; sostanzialmente sono state misurate le lunghezze dei cromosomi su disegni fatti con la camera lucida.

Le variazioni della somma delle lunghezze di tutti gli autosomi sono riportati nella tabella I.[a]. (L'*Anacridium aegyptium* L. ha 11 autosomi telomitici ed 1 eterocromosoma, che non viene considerato per il suo comportamento diverso.)

Il grado di accorciamento risulta più evidente dal rapporto dei valori delle lunghezze dei cromosomi nei diversi stadi della mitosi e della meiosi.

Nella tabella II.[a] sono riportati i rapporti delle lunghezze totali e di quelle dei singoli cromosomi riconosciuti attraverso la seriazione per lunghezza.

Nella mitosi spermatogoniale l'accorciamento dalla profase alla metafase vera e propria e di circa $^1/_3$ (a/d), quello dalla premetafase di $^1/_2$ (b/d). Dal diplotene alla I.a metafase meiotica (c_1/d_1) l'accorciamento e pure di $^1/_2$. Nella seconda divisione meiotica l'accorciamento dalla profase alla metafase (a_{11}/c_{11}) è approssimativamente eguale a quello della mitosi spermatogoniale. Considerando i singoli cromosomi, si vede che dalla premetafase alla metafase mitotica l'accorciamento dei cromosomi più lunghi è maggiore di quello dei cromosomi più corti; nella meiosi, dallo zigotene al pachitene l'accorciamento è maggiore nei più corti, negli altri stadi si accorciano di più i cromosomi più lunghi. Calcolando la correlazione (spuria) tra lunghezze e rapporti, questa constatazione è confermata.

Naturalmente vanno fatte delle riserve sul riconoscimento dei cromosomi poichè quasi sicuramente le modificazioni cromosomiche non sono sincrone entro uno stesso nucleo ed il riconoscimento degli stadi e soggettivo; l'esame complessivo e l'andamento dei dati, che qui non possono essere riportati per esteso, mostrano che i valori su riportati sono probativi, almeno per lo scopo della ricerca.

Complessivamente i dati qui riportati possono essere inquadrati con le conoscenze attuali sul comportamento dei cromosomi nella mitosi e nella meiosi; un esame dettagliato verrà presentato quando saranno completate le ricerche in corso su questo argomento.

G. Colombo

Istituto di Zoologia e di Anatomia Comparata dell'Università di Padova, il 2 agosto 1951.

[1] A. H. Sparrow, C. L. Huskins e G. B. Willians, Canad. J. Res. *19*, 323 (1941).
[2] I. Manton, Ann. Bot. London N. S. *9*, 155 (1945); Biol. Rev. *25*, 486 (1950).
[3] G. Svärdson, Swedish State Inst. Fresh-Water Research, Drottningholm; Rep. No 23 (1945).

[1] Y. Kuwada e T. Nakamura, Cytologia *6*, 78 (1934).
[2] C. D. Darlington, Proc. Roy. Soc. [B] *128*, 33 (1935).

Tabella I.[a]

	Mitosi spermatogoniale *				Meiosi						
					I.a divisione				II.a divisione		
	a	*b*	*c*	*d*	a_1	b_1	c_1	d_1	a_{11}	b_{11}	c_{11}
n	5	5	5	10	6	6	10	5	4	4	4
$\bar{x}$	*281*	*189*	*131*	*96*	*937*	*546*	*197*	*95*	*208*	*65,5*	*57,5*
s	10,1	7,3	18,8	9,9	40,3	24,9	27,7	8,7	21,8	10,6	1,7
$s_{\bar{x}}$	4,8	3,3	8,4	3,1	13,1	10,1	8,6	3,9	10,9	5,3	1,7
$t_{0,05}\, s_{\bar{x}}$	*13,2*	*8,9*	*23,3*	*8,5*	*33,7*	*26,1*	*19,5*	*10,8*	*34,7*	*17,0*	*2,7*

n numero di nuclei misurati
$\bar{x}$ media
s deviazione standard
$s_{\bar{x}}$ errore standard
$t_{0,05}\, s_{\bar{x}}$ semiintervallo di fiducia delle medie per n-1 gradi di libertà
a profase della mitosi spermatogoniale (ultima)
b, *c* premetafasi della mitosi spermatogoniale (ultima)
d metafase della mitosi spermatogoniale (ultima)
a_1 zigotene
b_1 pachitene
c_1 diplotene
d_1 metafase
a_{11} profase della II.a divisione meiotica
b_{11} metafase della II.a divisione meiotica
c_{11} anafase della II.a divisione meiotica

* I valori riportati sono la metà di quelli effettivamente trovati essendo stato considerato il numero aploide di cromosomi per poter fare i confronti con gli altri stadi della meiosi.

Tabella II.[a]

Rapporti	Totali	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
1) a/d	2,95	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2) b/d	1,97	2,19	2,07	2,01	1,98	1,97	1,96	1,90	1,61	1,90	1,68	1,50
3) a_1/d_1	9,86	9,80	9,83	9,70	9,64	9,62	9,94	9,08	9,22	10,02	10,52	9,42
4) a_1/b_1	1,72	1,49	1,84	1,69	1,83	2,01	1,79	1,58	1,54	2,08	2,17	2,14
5) b_1/c_1	2,77	2,68	2,70	2,68	2,59	3,08	2,92	2,86	3,20	3,20	2,90	2,85
6) c_1/d_1	2,07	2,41	2,22	2,14	2,03	1,73	1,90	1,98	2,00	1,92	1,66	1,44
7) a_{11}/b_{11}	3,17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

$a, b, \ldots a_1, b_1, \ldots a_{11}, c_{11}, \ldots$: stadi della cariocinesi come nella tabella I.a
I, II, III, ... : i valori per i singoli cromosomi, seriati secondo la lunghezza

Summary

The lengths of the chromosomes during mitotic and meiotic cycles of the male germ cells of *Anacridium aegyptium* L. (Orthoptera) have been measured: the shortening of the chromosomes was found to be about the same in the spermatogonial mitosis and in the 2nd meiotic division from prophase to metaphase (about 3:1); as well as from the premetaphase to the mid-metaphase of mitosis and from diplotene to the 1st metaphase of meiosis (about 2:1). In mitosis the longer chromosomes become shorter than the shorter ones; the contrary is true for zygotene to pachytene; the same in the other stages of meiosis.

Wirkung ultraharter Strahlung (31-Me V-Betatron) auf die Eier von *Drosophila melanogaster*

Der Letalitätstest mit Eiern von *Drosophila melanogaster* erfüllt die meisten Bedingungen, die von einem strahlenbiologischen Experiment gefordert werden müssen, wie genügend großes und statistisch verwertbares Material, Homogenität, leichte Erkennbarkeit der Strahlenreaktion und Vergleichsmöglichkeit mit bereits durchgeführten Untersuchungen. Wir gebrauchten unter anderem diesen Test, um die Wirkung der 31-Millionen-eV-Betatronstrahlen zu studieren.

1. *Versuchsanordnung.* In 3 Plexiglasgefäße wurden allwöchentlich etwa je 150 Drosophilapärchen («Berlin-Inzucht»-Stamm) gebracht, die ihre Eier auf auswechselbare, mit Hefe geimpfte Futternäpfchen (Mais-Zucker-Agar) legten. Um einen Vergleich mit den Versuchen von Dittrich und Mitarbeitern[1] an einem 6-MeV-Betatron zu ermöglichen, wurden die Futternäpfchen ebenfalls bei den 3-Stunden-Eiern während 2 Stunden, bei den 4- und 7½-Stunden-Eiern während 2½ Stunden in den Sammelzuchtgefäßen gelassen. Da die Bestrahlung 3, 4 und 7½ Stunden nach Beginn der Eiablage erfolgte, beträgt das wahre durchschnittliche Alter der Eier 2 ± 1 h, $2{,}75 \pm 1{,}25$ und $6{,}25 \pm 1{,}25$ h. Mit einem Pinsel wurden die Eier gesammelt, zur Reinigung in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und auf den Boden (1 cm Durchmesser) einer Victoreen-Kammer für 25 r gelegt, die gleich konstruiert war wie die entsprechende Dosismeßkammer und in der lediglich die

[1] W. Dittrich, H. Fass, G. Höhne und G. Schubert, Strahlentherapie *81*, 223 (1950).

Elektrode fehlte. Diese Versuchsanordnung gestattet es, die Versuche unter genau denselben Bedingungen durchzuführen, in denen auch die Messungen erfolgen. Für jeden Meßpunkt wurden im Mittel in 3 Versuchen je 1000 Eier geprüft.

Bestrahlt wurde mit dem 31-Millionen-Elektronenvolt-Betatron (Firma Brown-Boveri) in der radiotherapeutischen Klinik der Universität Zürich, das ultraharte Röntgenstrahlen liefert. Da die 3 Altersstadien sich als verschieden strahlensensibel erweisen, mußten für jedes Alter verschiedene Abstände von der Antikathode gewählt werden, um die maximale Bestrahlungszeit von 5 min nicht überschreiten zu müssen. So erhielten die 3-Stunden-Eier mit einem Abstand von 46,5 cm 41 r/min, die 4-Stunden-Eier 209 r/min in 30,6 cm Entfernung und die 7½-Stunden-Eier 101,7 r/min bei einer Antikathoden-Entfernung von 39,1 cm. Die Auszählung wurde 48 h nach Bestrahlung vorgenommen.

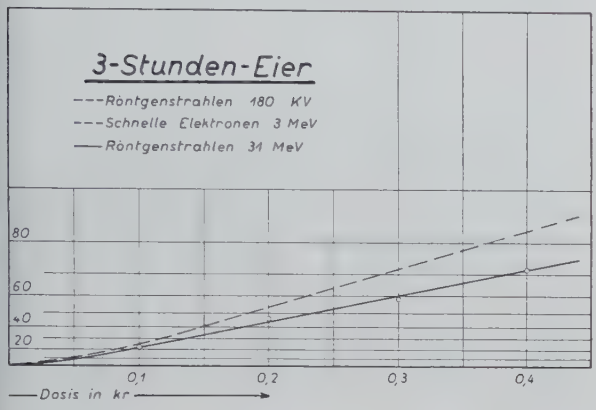


Abb. 1. Wirkung von Röntgenstrahlen (180 keV, 6 mA, HWS 0,25 mm Cu, 185 r/min), schnellen Elektronen (3 MeV) und ultraharten Röntgenstrahlen (31 MeV, 15 mm Pb HWS, FHA 46,5 cm, 41 r/min) auf die Eier von *Drosophila melanogaster* im durchschnittlichen Alter von 2 ± 1 h. Daten für schnelle Elektronen und 180-keV-Röntgenstrahlen nach Dittrich.

2. *Die Wirkung der 31-MeV-Betatronstrahlen im Vergleich zu schnellen 3-MeV-Elektronen- und 180-keV-Röntgenstrahlen.* Grundsätzlich muß betont werden, daß als Röntgenschädigung nicht der eigentliche Tod der Embryonen in der Eihülle festgestellt werden kann, sondern lediglich die Unfähigkeit der mehr oder weniger weit entwickelten Embryonen zum Schlüpfen aus der Eihülle. Vielfach wuchsen nach der Bestrahlung die Tiere zu schlüpfreifen Lärvchen heran, ein Vorgang, den wir (Fritz[1]) bereits bei der Bestrahlung junger Puppen beobachten konnten, die zum größten Teil, selbst nach einer Dosis von 80000 r zu schlüpfreifen Puppen sich entwickelten. In den Kontrollversuchen wurde ferner eine spontane Schädigungsrate von 10,5% festgestellt, die in der kurvenmäßigen Darstellung in Abzug gebracht worden ist.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, liegen die Schädigungswerte der 31-MeV-Betatronstrahlen etwas unter den Werten, die durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen von 180 keV und schnellen Elektronen (3 MeV) gewonnen worden waren. Merkwürdigerweise scheint demnach die Wirkung schneller Elektronen und 180-keV-Röntgenstrahlung gleich zu sein, während die ultraharten elektromagnetischen Strahlen von 31 MeV eine etwas geringere biologische Wirksamkeit besitzen. Die Unterschiede könnten zum Teil auch durch unterschiedliche Drosophila-Stämme bedingt sein.

[1] H. Fritz, Strahlentherapie *85*, 233 (1951).

Während für die 4-Stunden-Eier die Effekte der schnellen Elektronen und der 180-keV-Röntgenstrahlen voneinander außerordentlich stark abweichen, deckt sich die Wirksamkeit der 31-MeV-Strahlen mit derjenigen von schnellen Elektronen (Abb. 2).

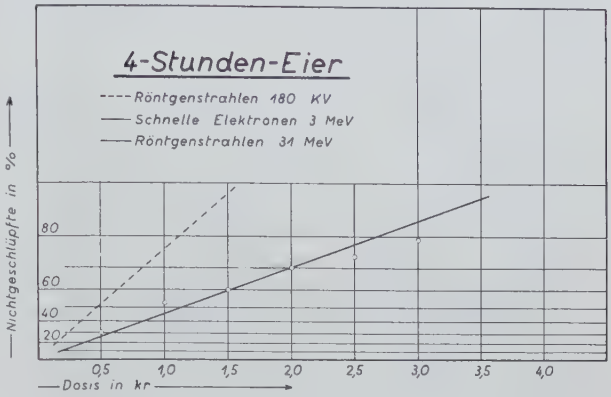


Abb. 2. Schädigungskurven an 4-Stunden-Eiern mit dem durchschnittlichen Alter von 2¾ ± 1¼ h. FHA 33,6 cm und 209,0 r/min für die Bestrahlung mit 31-MeV-Strahlen.

Abbildung 3 läßt eine deutlich unterschiedliche Wirkung der drei Strahlenarten erkennen, und zwar ist die Bestrahlung mit schnellen Elektronen weniger effektiv als diejenige mit Röntgenstrahlen von 180 keV, und ebenfalls ist die biologische Wirksamkeit des 31-MeV-Betatrons geringer als der Effekt schneller Elektronen.

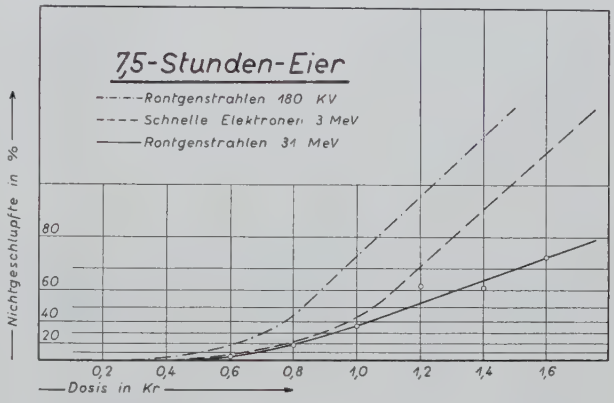


Abb. 3. Schädigungskurven an 7½-Stunden-Eiern mit dem durchschnittlichen Alter von 6¼ ± 1¼ h. FHA 39,1 cm und 101,7 r/min für die Bestrahlung mit 31-MeV-Strahlen.

3. *Deutung der Ergebnisse.* Die Versuche zeigen übereinstimmend, daß die biologische Wirksamkeit der 31-MeV-Betatronstrahlung gegenüber den 180-keV-Röntgenstrahlen und teilweise den schnellen Elektronen herabgesetzt ist (Tabelle).

Halbwertsdosen (Dosis, die 50% der Eier tötet) in r von 3-, 4- und 7½-Stunden-Eiern mit Röntgenstrahlen (180 keV), schnellen Elektronen (3 MeV) und 31-MeV-Betatronstrahlen.

Alter	180-keV-Röntgenstrahlen	Schnelle Elektronen	31-MeV-Röntgenstrahlen
3-Stunden-Eier . . .	200 r	200 r	237 r
4-Stunden-Eier . . .	460 r	1225 r	1117 r
$7^1/_2$-Stunden-Eier . .	825 r	1060 r	1167 r

Für diese unterschiedliche Wirkung der 31-MeV-Betatronstrahlen lassen sich vorderhand drei Deutungsmöglichkeiten denken.

a) Die unvermeidliche Ungenauigkeit in der Dosismessung der Betatronstrahlen kann störend wirken. Die Versuchsergebnisse streuten aber nur wenig und sind zu deutlich, als daß nur Meßfehler dafür verantwortlich gemacht werden können.

b) Es ist bekannt, daß Röntgenstrahlen schwächerer Energie und großer Wellenlänge Sekundärelektronen produzieren, die längs ihrer Bahn durch die Materie Ionisationen in dicht sich folgenden Häufchen hervorrufen. Harte Strahlen ionisieren weniger dicht, in großen Abständen und in wenigen Ionisationen pro «Häufchen». Faßt man die Strahlenwirkung gemäß der Treffertheorie als eine direkte auf, dann kann man sich entweder vorstellen, daß «schwerere» Treffer von großen Ionisationsgruppen biologisch wirksamer sind als «leichte» Treffer kleiner Gruppen. Andererseits ist die Wahrscheinlichkeit, einen minimalen Treffbereich mit mehreren Treffern zu treffen, für Strahlen mit geringer Ionisationsdichte ebenfalls herabgesetzt.

c) Es wäre denkbar, daß die diskontinuierliche Einstrahlungsart des 31-MeV-Betatrons in sehr kurzdauernden Röntgenblitzen von 10–15 Millionstelssekunden mit einem Intervall von 1/50 s die biologische Wirksamkeit herabsetzen kann.

Eine endgültige Deutung der herabgesetzten Wirksamkeit der ultraharten Strahlung gegenüber Röntgenstrahlung von 180 keV in unseren Versuchen, die übrigens auch durch Experimente mit einem 20-MeV-Betatron (Quastler[1] und andere) und mit schnellen Elektronen (Dittrich und andere) zum Teil an anderem Testmaterial gefunden worden ist, soll vorläufig nicht gegeben werden.

H. R. Schinz, Hedi Fritz-Niggli und E. Frey

Strahlenbiologische Abteilung der Radiotherapeutischen Klinik der Universität Zürich, den 25. September 1951.

Summary

Irradiation of 3-, 4-, and 7½-hour eggs of *Drosophila melanogaster* with a 31-MeV Betatron shows a decreased biological effectiveness of ultra-hard rays in comparison with weaker rays (180 keV), and, for the 3- and 7½-hour eggs, also in comparison with fast electrons (3 MeV).

[1] H. Quastler und R. K. Clark, Amer. J. Roentgenol. *54*, 723 (1945).

La spécificité biologique des acides désoxyribonucléiques de diverses espèces animales

Les travaux récents de Chargaff et de ses collaborateurs[1] indiquent des différences appréciables dans les proportions des bases puriques et pyrimidiques d'acides désoxyribonucléiques (A.D.N.) isolés à partir d'espèces animales diverses. Au cours d'une étude systématique sur la composition en bases d'A.D.N. provenant d'espèces zoologiques différentes, l'un de nous (R. T.) a eu l'occasion d'isoler ces acides sous forme hautement polymérisée et purifiée, à partir des matériaux suivants: thymus de veau, testicules de grenouille rousse (*Rana fusca*) et de grenouille verte (*Rana esculenta*), testicules et intestins de tritons (*Triton palmatus, Triton alpestris*) et d'axolotl (*Amblystoma mexicanum*), testicules d'étoile de mer (*Asterias glacialis*).

[1] E. Chargaff, Exper. *6*, 201 (1950).

Pendant que ces recherches étaient en cours, Mazia a fait connaître les curieux résultats de ses études sur la spécificité biologique d'A.D.N. d'origines différentes; il a constaté, en effet, que l'A.D.N. polymérisé isolé à partir de testicules de grenouille bloque, à faibles concentrations (0,01 à 0,05%), le développement des œufs de grenouille de la même espèce (*Rana pipiens*); au contraire l'A.D.N. du thymus de veau est sans effets sur le développement des œufs de grenouille aux mêmes concentrations. Mazia a, en outre, retrouvé un effet semblable dans le cas des œufs d'échinodermes. Il y aurait donc, selon Mazia, un effet inhibiteur spécifique de l'A.D.N. *homologue* sur le développement embryonnaire. Toutefois, comme le fait remarquer Mazia lui-même, le mécanisme de cet effet inhibiteur spécifique demeure mystérieux, car il paraît peu vraisemblable qu'une substance dont le poids moléculaire est de l'ordre du million puisse franchir la gangue, la membrane vitelline et le cortex des œufs de grenouille.

Ayant à notre disposition, ainsi qu'il a été dit plus haut, des A.D.N. purifiés dont la teneur en bases puriques et pyrimidiques avait été établie auparavant par chromatographie sur papier, il nous a paru utile d'examiner leurs effets biologiques spécifiques éventuels sur le développement embryonnaire. Les œufs, prélevés à un stade précoce de leur développement (segmentation ou début de la gastrulation), appartenaient aux espèces suivantes: *Rana fusca*, *Rana esculenta*, hybrides *Rana esculenta*♀ X, *Rana fusca*♂, *Triton alpestris*, *Triton palmatus*, *Amblystoma mexicanum*. Dans le cas de ces deux dernières espèces, de nombreux œufs ont été dégangués et débarassés de leur membrane vitelline avant d'être placés, au stade jeune gastrula, dans du liquide de Holtfreter stérile contenant de l'A.D.N. à diverses concentrations.

Les résultats de ces essais ont été malheureusement entièrement négatifs. Aux concentrations employées par Mazia (0,01 à 0,05%) aucun effet inhibiteur n'a été enregistré. Ce n'est qu'à des concentrations beaucoup plus élevées (0,25%) qu'un blocage du développement a été observé, mais sans que l'A.D.N. homologue se soit révélé plus efficace que celui provenant d'espèces zoologiques très éloignées (veau, étoile de mer). Des expériences de micro-injection d'A.D.N. dans des morulas de grenouille et d'axolotl n'ont pas davantage permis de mettre en évidence un effet inhibiteur spécifique de l'A.D.N. homologue.

Nous ignorons encore les raisons pour lesquelles nous n'avons pu reproduire les résultats obtenus par Mazia; il nous semble cependant vraisemblable que, conformément à une possibilité envisagée par Mazia lui-même, le blocage du développement qu'il a observé soit dû à une infection bactérienne plutôt qu'à un effet spécifique de l'A.D.N. homologue.

R. Thomas, M. Steinert, S. Gothié et J. Brachet

Laboratoire de morphologie animale, Faculté des sciences de l'Université libre de Bruxelles, le 28 septembre 1951.

Summary

We have been unable to confirm Mazia's finding that homologous D.N.A. exerts a specific inhibitory action on the development of amphibian eggs.

[1] D. Mazia, Growth *13*, Suppl. 5 (1949).

The Effect of Reticulo-Endothelial Blockade on Dermal Spreading of India Ink

The reticulo-endothelial functions were studied at our laboratory with the aid of radioactive colloids and we worked out a method of testing the colloid absorbing ability of the reticulo-endothelial system (RES) by means of labelled chromium phosphate colloid (Gabrieli[1]). Using this method we have studied the dynamics of blockade in the RES and estimated the degree and duration of the blockade induced by different colloidal substances (Gabrieli and Holmgren[1]).

Bogomolets[2] proposed the use of trypan blue as an indicator of the functional state of the RES in human beings. In this test the rapidity with which the intracutaneously injected trypan blue travels was followed. Recently Anigstein and Whitney[3] pointed out, by means of experimental typhus Rickettsiae infections, the connection between the RES, ground substance and hyaluronidase.

In the experiments reported below, we investigated the effect of blockade of the RES on the spreading of intracutaneously injected India ink.

Methods and Experiments. For our experiments we used fullgrown albino laboratory rats of about 150 g body weight. Hyaluronidase (5 VRU)[4] dissolved in 0·05 ml physiological saline solution and mixed with the same volume of India ink (the India ink was diluted with an equal volume of water) was injected intradermally on one side of the backs of the rats. The whole mixture amounted to 0·1 ml. The same mixture, but without hyaluronidase, was injected intracutaneously on the other side. Immediately after injection the size of the ink spots was traced on transparent paper. One hour later, the areas of the two India ink spots were recorded again and compared with the initial values.

In one series (using 33 rats) a blockade was produced by either intravenous or intraperitoneal injections of colloidal iron (50 mg per kg body weight "Ferrivenin", Benger's Ltd., England), while the control animals were given physiological saline solution intravenously or intraperitoneally instead of iron colloid. After 3–4 hours the dermal spreading of India ink was investigated.

In another series we studied the dermal spreading at different times after an intravenous blockade. In this series we used 15 VRU hyaluronidase. We injected colloidal iron (50 mg per kg body weight) intravenously and 3, 4, 7 and 24 hours later the dermal spreading effect of hyaluronidase was investigated, using three animals at a time. Six control rats were injected intravenously with physiological saline solution instead of colloidal iron, and the dermal spreading of India ink was tested 3 and 24 hours later in the same manner as in the blockaded animals.

Results. The results after intravenous and intraperitoneal blockade from the first series of experiments are summarized in the table. One hour after intradermal injection of India ink, the area increased much less in the intravenously blockaded animals than in the control animals.

The results of the second series proved that the inhibitory effect of the intravenous blockade on the spreading of India ink lasted only a few hours. Three hours after the intravenous blockade the spreading of the India ink had diminished and after four hours it reached a minimum. After five hours we noted an increased spreading of India ink which still remained after 24 hours (see Figure).

[1] E. R. Gabrieli, Acta physiol. Scand. *23*, 283 (1951).—E. R. Gabrieli and Hj. Holmgren, Scand. J. Clin. Labor. Invest. (in press).
[2] A. A. Bogomolets, Amer. Rev. Soviet. Med. *1*, 101 (1943).
[3] L. Anigstein and D. M. Whitney, Ann. New York Acad. Sci. *52*, 1091 (1950).
[4] Produced by the Medical Drug Company Leo, Sweden. The hyaluronidase was prepared from the bovine testicle.

Effect of RES blockade upon the dermal spreading of India ink in the presence and absence of hyaluronidase (5 VRU)

		Area of ink spots in mm². Mean (± error of mean)		
		Intravenous blockade (10 cases)	Intraperit. blockade (10 cases)	Controls (13 cases)
With hyaluronidase				
Immediately after injection	(a)	116·4	110·4	103·6
1 hour Later	(b)	213·4	263·8	317·0
Relative increase*	$\left(\frac{b}{a}\right)$	1·88 ± 0·24	2·62 ± 0·33	3·35 ± 0·46
Without hyaluronidase				
Immediately after injection	(a)	57·2	59·7	75·2
1 hour Later	(b)	92·1	94·9	135·5
Relative increase*)	$\left(\frac{a}{b}\right)$	1·65 ± 0·23	1·70 ± 0·14	1·99 ± 0·28
Difference in increase				
$d \pm \varepsilon d$		0·23 ± 0·33	0·92 ± 0·36	1·36 ± 0·54
t		0·70	2·56	2·52
P		0·492	0·020	0·012
Significance		No	probable	probable

* Mean of the relative increases of the areas in individual observations

$d \pm \varepsilon d$ = difference and error of difference

$t = \frac{d}{\varepsilon d}$

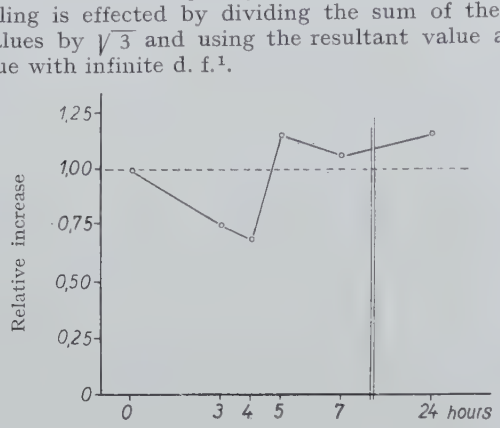
P = probability that the difference may arise at random (obtained by a t-analysis)

Definition of probability

$P > 0{\cdot}05$ no sign
$0{\cdot}05 > P > 0{\cdot}01$ probable sign
$P > 0{\cdot}01$ statistical sign

The measure $\left(\frac{b}{a}\right)$ is approximatelly normally distributed

If the relative increases in cases with and without hyaluronidase are compared, it is seen that the former values are consistently higher than the latter. If the t-values (third row from the bottom) of the three groups of experiments are pooled, the difference in question becomes statistically significant ($P < 0{\cdot}001$). The pooling is effected by dividing the sum of the three t-values by $\sqrt{3}$ and using the resultant value as a t-value with infinite d. f.[1].



The relative increase in rats of the spots of India ink (0·1 ml containing 15 VRU hyaluronidase) given intradermally at different times after i. v. administration of 50 mg per kg. body weight of colloidal iron. The relative increase was calculated by comparison of the areas, immediately and 60 minutes after the injection of India ink, and by division of this value with the mean value from 6 control animals, which were injected with physiological saline solution instead of colloidal iron. Each circle represents 3 experiments.

Discussion. The RES may be said to consist of the lymphatically and the haemovascularly located phagocytic elements. If a colloid is injected intravenously, it is taken up by the haemovascularly located reticuloendothelial cells. One cannot find iron colloids in the lymphatic macrophages after intravenous iron injection (Andersson and Rexed[2]). In the above mentioned experiments the hyaluronidase effect was tested intradermally. It is of interest to notice that after intravenous blockade we obtained a marked inhibition of the spreading of India ink.

Using Ferrivenin the inhibiting effect in the blockaded animals lasted a relatively short time. After five hours we could no longer show any inhibition of the spreading of India ink. This result was similar to that which we obtained when we investigated the blocking effect of Ferrivenin with the aid of radioactive colloids. The phagocytic ability of the RES was resumed in a few hours.

We intend to make a further study of the RES and the spreading effect. E. R. Gabrieli[3] and M. Campani

Department of Experimental Histology, Karolinska Institutet, Stockholm, April 2, 1951.

Zusammenfassung

Die intradermale Ausbreitung von chinesischer Tusche in Gegenwart von Hyaluronidase wird vermindert, wenn das retikuloendotheliale System mit kolloidalem Eisen (Ferrivenin) blockiert wird. Dieser Effekt ist größer, wenn Ferrivenin als blockierendes Agens intravenös anstatt intraperitoneal angewendet wird. Die Wirkung hält nur wenige Stunden an. Es wird auf die Ähnlichkeit verwiesen, die zwischen der Ausbildung der Blockade und der verminderten Ausbreitung der Tusche besteht.

[1] G. Goldberg *et al.*, Acta physiol. Scand. *22*, suppl. 77 (1950).
[2] N. Andersson and B. Rexed, Nordisk. Med. *42*, 1704 (1949).
[3] Present adress: Section of Medical Physics, Yale University School of Medicine, New Haven, Conn.

Autoradiographic Analysis of the Distribution of Labelled Ca and P in Bones

A microphotographic-photometric study of the X-ray absorption of bone ground substance revealed that minerals are unevenly distributed in the latter[1]. Resorption and new formation of bone tissue determine changes in the distribution of minerals in compact and spongy bone. The Ca content in recently formed pieces of secondary bone (e.g. Haversian systems, *osteons*) is in general from 10 to 12% lower than the Ca content in the fragments of the older periosteal bone or in the interstitial remnants of previously built osteons; the mineralization of the newformed osteons undergoes a slow and progressive increase.

Autoradiographs made from ground sections of bones compacta of young dogs a few hours after administration of labelled P, showed a greater activity of the matrix in recently laid down osteons than in the older primary bone tissue; viz., a larger number of labelled atoms is incorporate in the ground substance of the relatively less calcified pieces of secondary bone.

However, it remained open to question whether the different deposition of labelled atoms in the various structures of bone depends on the different situation of the latter in regard to the blood vessels, or on different physico-chemical properties of the ground substance itself. It is obvious that mineral atoms of the blood can be adsorbed more easily in the ground substance which neighbors the vascular channels than in the matrix which lies at a greater distance from blood vessels, namely in the interstitial systems.

A different technique was applied in this research to obtain further information on the alternative mentioned.

Ground sections of fresh bone compacta from 25 to 45 micra in thickness were kept from a few hours to a few days in solutions of radioactive Calcium chloride[2]. The sections, thoroughly washed in distilled water and dried at room temperature, were pressed against the emulsion side of photographic plates or films (C2 Ilford Nuclear Research plates, Ferrania X-ray films)[3]. This procedure has the advantage that the radioactive Ca comes in ready and almost uniform contact with each single particle of the bone section; thus the possibility that a different deposition of labelled atoms in the various structures of bone might depend on the topography of the latter in regard to blood vessels was ruled out.

Figures 1 and 2 illustrate the Roentgenmicrophoto (negative) of a cross section of the diaphysis of the femur (man 47 years old) with its corresponding autoradiograph after treatment with labelled Ca. It is apparent (fig. 2) that the radioactivity is not uniform throughout compacta. The comparison in the same section of the degree of radioactivity (fig. 2) with the degree of calcification of the various structures (fig. 1), demonstrates that a greater amount of radiocalcium is deposited in the ground substance of recently formed osteons; the Ca content of the latter is from 6 to 16% lower than that of the neighboring older bone tissue.

The distribution of Ca^{45} in the ground substance appears to be exactly the same as described above when

[1] R. Amprino and A. Engström, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *26*, 148 (1950); Acta anat. (in press).
[2] The author wishes to express his thankfulness to Prof. P. Lacroix, Louvain, who kindly supplied the Calcium chloride for these experiments.
[3] Technical details and a complete description of results will be published elsewhere.

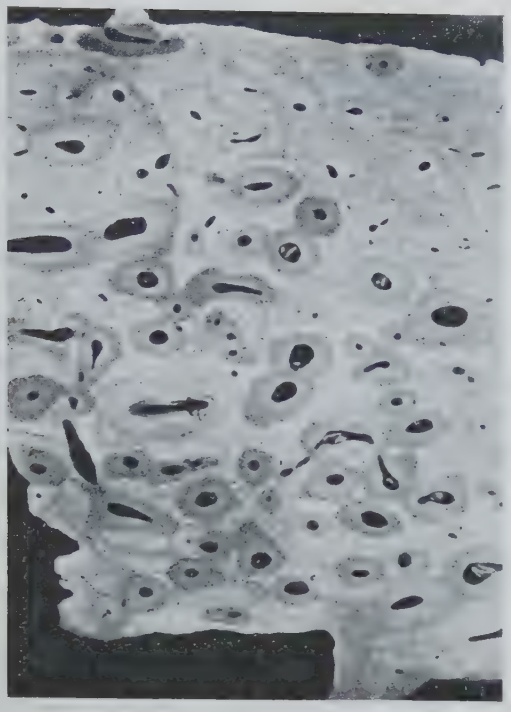


Fig. 1.

Fig. 2.

sections of bones, fixed and preserved in formalin (or ethanol) or sections of macerated bones from museum specimens, are treated with radioactive Calcium chloride. Autoradiographs of sections of bones fixed in formalin or ethanol and microincinerated for three hours at 700° C, still show slight differences in the uptake of labelled Ca into the various structures. Therefore, the different deposition of Ca^{45} in the various structures of bone compacta does not depend on quantitative differences of cell (or of enzyme) activity, but, partly at least, on differences of the proportion of organic to inorganic components of ground substance. The amount of Ca^{45} deposited seems to depend also on the proportion between osteomucoid and collagen of the matrix. As a matter of fact, the Ca^{45} uptake in sections of the same thickness is greater for bones of reptilians and of birds than for mammalian bones (cf. also the results of HEVESY *et al.*[1]); the deposition of Ca^{45} is relatively greater also in bones of young than of adult specimens of the same species (ox, man).

The deposition of P^{32} was tested on sections of bones contiguous to the ones which had been used for the study of Ca^{45} uptake. The distribution of P^{32} appeared to be the same as that of Ca^{45}; however, given the sections thickness, the definition of the autoradiographs was rather poor when P^{32} was used.

The fate of the atoms of radioactive elements and the mechanism of their fixation to bone matrix is still a matter of speculation[2]. It is obvious that labelled atoms can be incorporated into the ground substance which is progressively laid down[3]; however, the laying down of bone tissue is a slow process, while the uptake of labelled atoms occurs promptly[1]. It has been maintained for a long time that an exchange-reaction between the atoms of the fluid and of the solid phase takes place *in vitro* as well as *in vivo*. The superficial atoms of Ca of the apatite crystals could be replaced by atoms of Ca, U, Sr, etc. of the fluid phase[2]. Only 1/5 of the atoms of Ca of the crystals could thus be replaced[3]; according to HARRISON and HARRISON[4], the whole Ca of apatite could be progressively substituted by the labelled Ca of the body fluids.

The present research shows that the uptake of labelled Ca and P is remarkably greater in the more recently built and not yet fully mineralized structures than in the more calcified portions of bone. The different uptake might depend on a different rate of the exchange-adsorption of mineral atoms in the various structures of bone; or possibly, only a part of the atoms which are deposited in the recently laid down and less calcified structures exchange with pre-existing ones of the solid phase. Some might become progressively fixed to the already calcified matrix without liberation of atoms from the apatite crystals, viz., an actual *addition* of mineral atoms might occur. The latter alternative seems to be in good agreement with the progressive calcification of secondary bone as demonstrated by X-ray absorption analysis[5].

[1] G. HEVESY, Ann. Rev. Bioch. *9*, 641 (1940).

[2] N. S. MACDONALD, F. EZMIRLIAN, P. SPAIN, and C. MCARTHUR, J. Biol. Chem. *189*, 387 (1951).

[3] H. E. HARRISON and H. C. HARRISON, J. Biol. Chem. *185*, 857 (1950).

[1] R. F. RILEY, B. MCCLEARY, and R. E. JOHNSON, Amer. J. Physiol. *143*, 677 (1945).—M. FALKENHEIM, E. E. UNDERWOOD, and H. CARPENTER HODGE, J. biol. Chem. *188*, 805 (1951).

[2] M. FALKENHEIM, W. F. NEUMANN, and H. HODGE, J. Biol. Chem. *169*, 713 (1947).

[3] W. F. NEUMAN and R. F. RILEY, J. Biol. Chem. *168*, 545 (1947). —M. FALKENHEIM, W. F. NEUMAN, and H. HODGE, J. Biol. Chem. *169*, 713 (1947).—M. FALKENHEIM, E. E. UNDERWOOD, and H. CARPENTER HODGE, J. Biol. Chem. *188*, 805 (1951).

[4] H. E. HARRISON and H. C. HARRISON, J. Biol. Chem. *185*, 857 (1950).

[5] R. AMPRINO and A. ENGSTRÖM, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *26*, 148 (1950); Acta anat. (in press).

According to the present results, the amount of labelled mineral atoms which can be bound to the already calcified ground substance of a given bone seems to depend to a great extent on the relative amount of recently built and not yet fully calcified pieces of ground substance. Evidently the number of pieces of recently laid down bone tissue is greater the higher the rate of microscopic rebuilding. Thus, the activity of bones after treatment with radioactive elements should be greater the wider the reconstructive processes which occur in spongy and compact bone[1]. In this respect, the differences of activity of the skeleton of young and of mature animals of the same species after administration of labelled Ca or P or of U, Sr, etc.[2], might depend—at least partly—on the well-known differences of the rebuilding rate of the skeleton in the various stages of life[3].

The same reasoning might provide an explanation of the differences of radioactivity between diaphysis and epiphyses of long bones (cf. *i.al.*[4]); indeed, the rate of the microscopic reconstruction is higher throughout life in spongy bone of epiphyses and of metaphyses than in compact bone of diaphysis[5].

R. Amprino

Institute of Anatomy, University of Turin, August 5, 1951.

Zusammenfassung

Dünnschliffe von frisch fixierten oder mazerierten Knochen wurden *in vitro* der Einwirkung von radioaktiven Ca- und P-Salzen unterworfen. Die Autoradiographien beweisen, daß Ca^{45} und P^{32} in größerer Menge von den verhältnismäßig weniger kalzifizierten Abschnitten der Grundsubstanz des Knochens übernommen werden. Die Menge der anorganischen Salze, welche unter diesen Bedingungen von den verschiedenen Knochen aufgenommen wird, hängt hauptsächlich von der relativen Menge der vorhandenen organischen Substanzen und von den in der Grundsubstanz enthaltenen Osteomukoiden ab.

[1] R. Amprino, Arch. Sci. Biol. *31*, 208 (1946).

[2] M. Falkenheim, W. F. Neuman, and H. Hodge, J. Biol. Chem. *169*, 713 (1947).—W. F. Neuman, M. W. Neuman, and B. J. Mulryan, J. Biol. Chem. *175*, 705 (1948).—H. E. Harrison and H. C. Harrison, J. Biol. Chem. *185*, 857 (1950).—N. S. MacDonald, R. E. Nusbaum, R. Stearns *et al.*, J. Biol. Chem. *188*, 137 (1951).—D. C. Jones and D. Harold Copp, J. Biol. Chem. *189*, 509 (1951).

[3] R. Amprino and A. Bairati, Z. Zellfschg. *24*, 439 (1936).—R. Amprino and G. Godina, Comm. Pont. Acad. Sci. *11*, 329 (1947).

[4] M. Manly LeFevre and W. F. Bale, J. Biol. Chem. *129*, 125 (1939).—R. S. Manly, H. C. Hodge, and M. LeFevre Manly, J. Biol. Chem. *134*, 293 (1940).—G. Ch. Hevesy, H. B. Levi, and O. H. Rebbe, Bioch. J. *34*, 532 (1940).—W. F. Neuman and R. F. Riley, J. Biol. Chem. *168*, 545 (1947).—W. D. Armstrong and C. P. Barnum, J. Biol. Chem. *172*, 199 (1948).—N. S. McDonald, R. E. Nusbaum, R. Stearns *et al.*, J. Biol. Chem. *188*, 137 (1951).—P. Lacroix, R. Devis, and E. Schicks (in press).

[5] R. Amprino, Monit. Zool. ital., Suppl. *56*, 142 (1948).

L'utilisation du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium pour l'étude de l'activité déshydrogénasique des mitochondries

Le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (TPT), obtenu par von Pechman et Runge[1], est un dérivé incolore, très soluble dans l'eau, qui, sous l'action des réducteurs – inorganiques (hydrosulfite de sodium, sulfure d'ammonium, etc.) ou organiques – se transforme en un corps fortement coloré en rouge, insoluble dans l'eau, soluble dans de nombreux solvants organiques, le triphénylformazan. Nous nous trouvons donc en présence d'un système dont la forme colorée est représentée par l'état réduit, fait particulièrement remarquable pour son utilisation en vue de la détermination des déshydrogénases.

Nous avons utilisé la méthode de Green (homogénéisation au mixeur, centrifugation dans une solution de KCl à 9‰)[1] pour la préparation de mitochondries (cyclophorase) de foie et de rein de rat et de lapin. La technique adoptée pour l'étude de l'activité déshydrogénasique est la suivante: à une quantité donnée de suspension de mitochondries (1 cm³), on ajoute un tampon phosphate 0,2 M à pH 7,3 (0,5 cm³), le substrat correspondant à l'enzyme à étudier et des activateurs variables selon les cas ($MgCl_2$, adénosinetriphosphate, etc.). Après avoir complété à un volume donné (3 cm³) par de l'eau bidistillée, on ajoute 1 cm³ d'une solution aqueuse de TPT à 0,1%. Il est indispensable d'utiliser une solution fraîchement préparée de TPT et maintenue à l'abri de la lumière. En effet, le TPT, très stable à l'état anhydre, s'altère en solution aqueuse sous l'action de la lumière qui, par une réaction d'oxydoréduction interne, le transforme en triphénylformazan et en chlorure de 2,3-(*o*-biphénylène)-5-phényltétrazolium[2]. On porte au bain-marie à 37°C pendant 20 min et on extrait alors le formazan.

L'extraction de la totalité du colorant est difficile en raison de l'adsorption d'une partie de celui-ci sur les mitochondries. L'adjonction d'acides ou de bases forts décolore le formazan et est donc à rejeter. L'acétone (6 cm³) permet une extraction satisfaisante, à condition d'agiter fortement; l'adjonction d'acide trichloracétique (1 cm³ à 40%)[3] n'est pas utilisable pour l'extraction du triphénylformazan, car elle décolore celui-ci. Les détergents (zéphyrol) ne facilitent pas l'extraction. En dehors de l'acétone, nous avons obtenu une excellente extraction par le mélange suivant: alcool éthylique, 5 cm³ + alcool nonylique (ou caprylique), 1 cm³.

Après adjonction du solvant, on agite, centrifuge, filtre et mesure l'absorption du filtrat à 492 mμ. Les lectures ont été faites à cette longueur d'onde à l'aide d'un spectrophotomètre de Beckman, modèle DU. Nous avons déterminé la courbe d'absorption du TPT et du triphénylformazan et trouvé qu'alors que le premier de ces corps n'absorbe pas dans le visible, le second (dissous dans un solvant organique, l'acétone par exemple) absorbe fortement entre 400 et 550 mμ, avec un maximum à 492 mμ ($\varepsilon \times 10^{-3} = 14{,}9$). Dans l'ultraviolet, TPT et formazan (ce dernier dissous dans l'éther et non dans l'acétone vu la forte absorption de ce solvant) absorbent fortement au-dessous de 310 mμ, avec un maximum à 245 mμ pour le TPT et 295 mμ pour le formazan. Rejoignant les conclusions de Kun et Abood[4], nous avons d'autre part établi que la densité optique des solutions de formazan est bien une fonction linéaire de la concentration, aussi bien dans le visible que dans l'ultraviolet. Ce fait permet donc aisément la détermination spectrophotométrique de la concentration en formazan.

Les lectures d'absorption doivent être faites peu de temps après la fin de la réaction. En effet, si le formazan est relativement stable en solution dans l'acétone ou

[1] H. von Pechmann et P. Runge, Ber. Dtsch. chem. Ges. *27*, 2920 (1894).

[1] D. E. Green, W. F. Loomis et V. H. Auerbach, J. Biol. Chem. *172*, 389 (1948).

[2] F. Weygand et I. Frank, Z. Naturforsch. *3b*, 377 (1948).

[3] A. M. Rutenburg, R. Gofstein et A. M. Seligman, Cancer Res. *10*, 113 (1950).

[4] E. Kun et L. G. Abood, Science *109*, 144 (1949).

l'éther purs (nous n'avons pas noté de modification importante de la densité optique de telles solutions après plusieurs jours), il n'en va pas de même lorsque, comme dans nos expériences enzymatiques, le formazan se trouve solubilisé dans un mélange eau-acétone contenant de nombreuses autres substances (substrat, activateurs, etc.). Dans ces expériences, nous avons constaté que le formazan se décolore assez rapidement et de façon irrégulière.

Quant à l'influence du pH sur la réduction du TPT, elle nous est apparue négligeable entre pH 4,0 et 12,5. Par contre, la réduction ne se fait plus que de façon incomplète au-dessous de pH 4,0.

L'utilisation de la méthode décrite nous a permis de classer les déshydrogénases étudiées de mitochondries de foie dans l'ordre suivant d'activité décroissante: citrico-, succino-, α-cétoglutaro-, pyruvo-, malico-, lacticodéshydrogénase. Ces données ne sont cependant valables que lorsque la préparation a été faite avec un maximum de précautions (température suffisamment basse, rapidité des manipulations, absence de contact entre la préparation et les parties métalliques de l'homogénéiseur, etc.); sinon, l'altération de la préparation enzymatique se traduit par une réduction de l'activité de toutes les déshydrogénases; la succinodéshydrogénase étant la moins atteinte, son activité devient alors supérieure à celle de la citricodéshydrogénase. Nous avons vérifié, en ce qui concerne la citricodéshydrogénase, que la formation de formazan (exprimée en microgrammes de formazan formés par gramme de tissu frais) est une fonction linéaire du temps dans les 60 premières minutes.

Nous avons enfin mené parallèlement aux déterminations par la méthode du TPT, des dosages d'activité des mêmes déshydrogénases par la méthode de Warburg et par celle de Thunberg (accepteur d'hydrogène: 1 cm^3 d'une solution à 0,1% de dichlorophénol-indophénol). Nous avons constaté ainsi l'absence de parallélisme entre les données de ces trois méthodes. La succinodéshydrogénase est, en effet, plus active que la citrico-déshydrogénase tant par les techniques de Warburg que par celle de Thunberg. Si ce fait n'a rien de surprenant en ce qui concerne la première (qui mesure toute une suite de réactions enzymatiques – dont les déshydrogénases ne sont qu'un maillon – aboutissant à l'utilisation d'oxygène moléculaire), la non-concordance des résultats entre les deux autres méthodes nous paraît devoir être attribuée à la nature même de l'accepteur, ainsi peut-être qu'à une inactivation partielle du complexe enzymatique au cours des manipulations nécessaires dans la technique de Thunberg[1].

En résumé, l'ensemble des propriétés physiochimiques du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium que nous avons étudiées (coloration à l'état réduit, étendue de la bande de pH dans laquelle peut s'effectuer la réduction, validité de la loi de Beer-Lambert pour le formazan, etc.) nous a permis son utilisation pour la détermination de l'activité déshydrogénasique de mitochondries (cyclophorase) de foie de rat et de lapin. Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux de déterminations menées parallèlement par les méthodes de Warburg et de Thünberg.

J. Nordmann, R. Nordmann et Odette Gauchery

Laboratoire de biochimie, clinique chirurgicale de la Salpêtrière, Paris, le 10 septembre 1951.

[1] J. Nordmann, R. Nordmann et O. Gauchery, Bull. Soc. Chim. biol. (sous presse).

Summary

The quantitative determination of dehydrogenase activity in mitochondria, using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as H-acceptor, is described. The results obtained with this technique are compared with those given by the methods of Warburg and Thunberg.

Über das Verschwinden von Adenosintriphosphat bei der Superpräzipitation von Aktomyosin-Gel

Obgleich eine Reihe von Forschern die Ansicht vertritt[1], daß die durch Adenosintriphosphat (ATP) hervorgerufene Synärese («Kontraktion») von Aktomyosin (AM) mit einem Abbau dieses Nukleotids einhergeht, ist ein direkter Nachweis dieses Abbaus aus methodischen Gründen bisher nicht gelungen. Die interessanten Befunde Buchthals[2], nach denen durch Einwirkung von ATP auf Fadenknäuel von AM-Gel ein relativ geringfügiger Einbau von Purin und Phosphat [etwa im gleichen Verhältnis wie in der Adenosindiphosphorsäure (ADP)] in das Myosin stattfindet, sind für das vorliegende Problem nicht heranzuziehen, da die lange Einwirkungsdauer vor der Analyse (etwa 30 min) über Vorgänge bei der Kontraktion selbst direkt nichts aussagt. Die größte Schwierigkeit ist wohl in der mit der «Kontraktion» gleichzeitig einsetzenden Wirkung der ATPase zu sehen[3], die gleichfalls zum Verschwinden von ATP (durch Abbau zu ADP) führt. Zur Differenzierung zwischen Kontraktion und ATPase-Wirkung empfiehlt sich nach unseren Erfahrungen die Anwendung von SH-Gruppen blockierenden Substanzen [zum Beispiel metallorganischen Quecksilber(2)- und Arsen(3)-Verbindungen], mit deren Hilfe es gelingt, diese Vorgänge wahlweise und reversibel «einzufrieren»[4]; allerdings ist es uns bisher nie gelungen, bei erhaltener Kontraktion die ATPase auszuschalten. Mit der von uns früher[5] angegebenen Methode der quantitativen Messung der AM-«Kontraktion» war der Einsatz der für die ATP-Bestimmung notwendigen Substanzmengen möglich. Für diese Bestimmung erwies sich die für ATP spezifische *Beeinflussung der Viskosität* von AM-Sol als ein auch in quantitativer Hinsicht geeignetes Verfahren[6]; denn die Länge des waagrechten Teils der Viskosität-Zeit-Kurve ist in Gegenwart von Magnesiumionen bei einer bestimmten ATPase-Aktivität des AM-Sols ein direktes Maß für die anfangs zugefügte ATP-Menge[6]. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, verschwindet während der «Kontraktion» bei richtiger Dosierung das zugefügte ATP weitgehend, während im Kontrollversuch [bei dem *m*-Amino-*p*-oxyphenylarsen(III)-oxyd (oxarsan) die Kon-

[1] Vgl. zum Beispiel H. H. Weber, Vortrag Bunsen-Tagung, 1951.

[2] F. Buchthal, A. Deutsch, G. G. Knappeis und A. Munch-Petersen, Acta physiol. Scand. *13*, 167 (1947).

[3] Abweichend von Szent-Györgyis Befunden [vgl. zum Beispiel Hung. acta Physiol. *2*, Nr. 1–4 (1949), zitiert nach [7]], wonach nur kontrahiertes AM-Gel als magnesiumaktivierbare ATPase wirkt, finden wir in unseren Versuchen, daß auch nach Hemmung der Kontraktion durch die Arsen(3)-Verbindung Oxarsan die ATPase wirksam bleibt.

[4] F. Turba und G. Kuschinsky, Naturwissenschaften *37*, 453 (1950). – Vgl. auch G. Kuschinsky und F. Turba, Bioch. biophys. acta *6*, 426 (1951).

[5] G. Kuschinsky und F. Turba, Biochem. Z. *321*, 39 (1950).

[6] G. Kuschinsky und F. Turba, Bioch. biophys. Acta *6*, 426 (1951). – Vgl. auch A. Csapó, Acta physiol. Scand. *19*, 101 (1949).

[7] N. K. Sarkar, A. G. Szent-Györgyi und L. Varga, Enzymologia *14*, 267 (1950).

traktion gehemmt, die ATPase dagegen ebenso wie im Kontraktionsversuch unverändert gelassen hat] der größte Teil des ATP noch erhalten ist. Zur gleichen Zeit ist ein Zuwachs an anorganischem Phosphat in einer entsprechenden Größenordnung festzustellen, zum Beispiel 148 γ anorganisches P (Kontraktionsversuch) gegenüber 48 γ P (ohne Kontraktion); Summe aus anorganischem und säurelabilem P: 404 bzw. 448 γ.

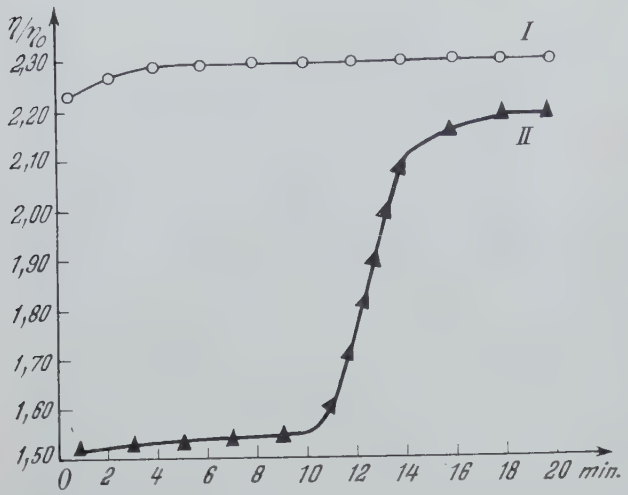


Abb. 1.
Verschwinden von ATP bei der «Kontraktion» von Aktomyosin-Gel Abszisse: Zeit in Minuten; Ordinate: relative Viskosität. Ansatz I: 5 cm³ AM-Gel (etwa 1,4 mg N/cm³), 1 cm³ ATP-Lösung (5 mg lufttrockenes Ba-ATP umgefällt als Mg-Salz/cm³), nach etwa 10 s 1 cm³ Oxarsanlösung (4,7 mg/cm³), sofort dazu 1 cm³ Salyrganlösung (5 mg/cm³) zur Ausschaltung der ATPase, die von Oxarsan nicht gehemmt wird, 2 cm³ Wasser, abzentrifugiert. Volumen des superpräzipitierten Gels 0,5 cm³. 0,75 cm³ der überst. Lösung + 0,25 cm³ 4 mKCl + 0,3 cm³ BAL (0,1 cm³/14 cm³ Wasser) zur Ausschaltung der Hemmung durch die Schwermetallverbindungen; + 2 cm³ AM-Sol; 2 cm³ zur Viskositätsmessung. – Ansatz II: wie I, aber zunächst 1 cm³ Oxarsanlösung 10 min (Zimmertemperatur) einwirken lassen, dann ATP-Zusatz usw. Volumen des abzentrifugierten Gels 3,2 cm³. – 0 = Beginn der viskosimetrischen Messung.

Ein Verschwinden von ATP durch Adsorption an das Protein ist auch deshalb auszuschließen, weil nach Trichloressigsäure-Behandlung nicht wesentlich mehr ATP nachzuweisen ist. Wir sind damit beschäftigt, die entstandenen Ab- und Umbauprodukte des ATP chemisch zu identifizieren. Das bei der Kontraktion beobachtete Verschwinden von ATP unterscheidet sich durch die große Geschwindigkeit des Vorgangs von der als ATPase bezeichneten Fermentwirkung. Ob es sich auch im ersten Fall um eine echte Fermentwirkung handelt, ist zunächst nicht zu entscheiden. Wenn man ATP zu AM-Sol hinzufügt, findet sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen Befunden *kein* Unterschied im ATP-Gehalt der Lösungen in Abhängigkeit von dem Eintritt oder der Hemmung der Dissoziation (Abb. 2) (Versuchsanordnung in Parallele zur «Kontraktion» bei niederen Ionenstärken). Auch dieses Ergebnis weist darauf hin, daß ATP nur unter den Bedingungen, die zu einer «Kontraktion» führen, in der oben beschriebenen Weise verändert wird. Im Zusammenhang mit den Resultaten von Weber liegt also die Annahme einer Freisetzung von Energie aus dem ATP während der «Synärese» des AM-Gels nahe. Das läßt sich in Einklang mit Befunden von Sarkar, Szent-Györgyi und Varga[1] bringen, wo-

[1] N. K. Sarkar, A. G. Szent-Györgyi und L. Varga, Enzymologia *14*, 267 (1950).

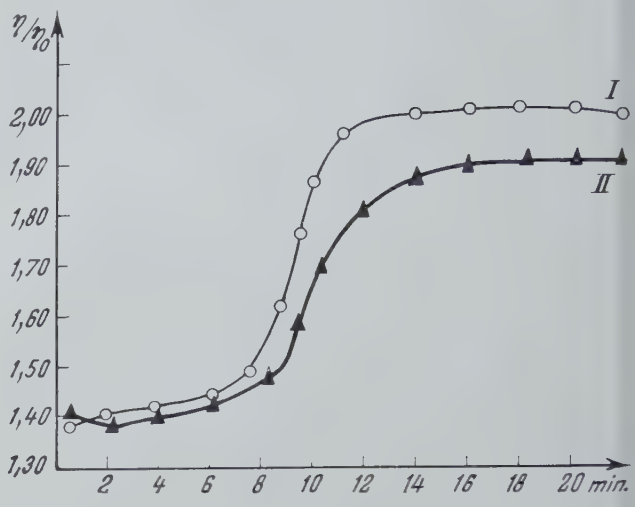


Abb. 2. – Verhalten des ATP im Versuch mit AM-Sol unter den in Abbildung 1 angegebenen Versuchsbedingungen. Abweichend davon statt 2 cm³ Wasser 2 cm³ Trichloressigsäure (40%), danach Trichloressigsäure fünfmal mit Äther ausgeschüttelt.

nach in der glyzerinextrahierten Muskelfaser Freisetzung von Phosphat und entwickelte Spannung einander parallel gehen.

Der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

G. Kuschinsky, F. Turba und I. Köhler

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den 15. Oktober 1951.

Summary

(1) In the synerizing ("contraction") of actomyosin gel, the ATP added disappears almost completely, while in the control experiment (contraction inhibited, ATPase intact), the greater part of the ATP remains.

(2) At the same time there is a corresponding increase in free inorganic phosphate.

(3) In analogous experiments with actomyosin sol, in contrast to the findings mentioned above, no difference in the ATP content of the solutions is found, irrespective of whether the dissociation into actin and myosin occurs or is inhibited.

Azione dell'insulina e della difosfotiamina sull'ATP (Adenosinatrifosfato) del fegato

Nel diabete sperimentale da allossana e nel diabete mellito l'insulina agisce favorendo i processi di fosforilazione della tiamina[1]. Questi processi in tali condizioni patologiche risultano nettamente alterati[2]. È anche noto che nel diabete pancreatico (da spancreatizzazione e da allossana) esiste una deficienza di ATP e di fosfocreatina[3]. Tenendo presenti le osservazioni di Lipton e Elvehjem[4] e di Weil-Malherbe[5] secondo le quali *in*

[1] D. Siliprandi e N. Siliprandi, Nature, 1951 (in corso di stampa). – N. Siliprandi e F. Navazio, Acta med. Scand. 1951 (in corso di stampa).

[2] D. Siliprandi e N. Siliprandi, Acta vitaminologica *5*, 3 (1951).

[3] A. Moschini, C. r. Soc. Biol. *111*, 668 (1932). – Th. Cahn e J. Houget, C. r. Acad. Sci. Paris *203*, 354 (1936). – V. Baccari, Boll. Soc. it. Biol. Sper. *25*, 356 (1949).

[4] M. A. Lipton e C. A. Elvehjem, J. Biol. Chem. *136*, 637 (1940).

[5] H. Weil-Malherbe, Bioch. J. *33*, 1997 (1939).

vitro (in presenza di vari substrati: lievito o estratti di tessuti animali) la fosforilazione della tiamina avviene per trasferimento di radicali fosforici dall'ATP alla tiamina libera o alla tiamina monofosfato, si può avanzare l'ipotesi che deficienza di esteri fosforici ricchi di energia e difetto di fosforilazione della tiamina nell'organismo diabetico siano in qualche modo legati fra di loro.

Se tale ipotesi è esatta, la somministrazione di insulina dovrebbe essere seguita nell'organismo diabetico oltre che da un aumento della difosfotiamina, anche da un aumento di ATP.

Abbiamo preso in considerazione nella presente ricerca il comportamento del fosforo labile (P_{ATP}) (costituito, come è noto, essenzialmente dal fosforo che si libera per idrolisi dell'ATP) nell'animale diabetico in rapporto all'azione dell'insulina. Poichè d'altra parte avevamo dimostrato che la difosfotiamina esplica nel diabete pancreatico un'azione insulinosimile[1], ci è parso interessante studiare anche il comportamento del P_{ATP} dopo somministrazione di questo coenzima.

A tale scopo abbiamo determinato il P_{ATP} del fegato secondo il metodo di Potter et collaboratori[2] in 11 ratti normali, in 11 ratti diabetici ed in 11 ratti diabetici dopo trattamento rispettivamente con insulina e con difosfotiamina (DPT)[3].

Ratti	No animali	P_{ATP} mg p. 100 g fegato fresco media ± errore standard
Normali	11	23,8±1,04
Diabetici	11	12,9±0,41
Diabetici + insulina	11	20,3±0,95
Diabetici + DPT	11	21,8±1,03

Media dei valori del P_{ATP} di fegati di ratti normali e diabetici per allossana. Ai ratti diabetici l'insulina è stata iniettata per via intramuscolare alla dose di 30 U.I./kg e la difosfotiamina (DPT) alla dose di 45 mg/kg. Gli animali trattati venivano uccisi per decapitazione 60 e 90 minuti dopo la somministrazione dell'insulina e della DPT rispettivamente.

Questi risultati dimostrano che nei ratti diabetici per allossana si ha una diminuzione del P_{ATP} del fegato: ciò conferma le precedenti ricerche di Moschini, Cahn e Houget e di Baccari[4]. Sia l'insulina che la DPT riportano i valori del P_{ATP} alla norma.

Siamo quindi autorizzati ad ammettere che entrambe queste sostanze agiscono in ugual misura sulla sintesi dell'ATP nell'animale diabetico.

L'incremento dell'ATP dopo somministrazione di insulina si può ascrivere alla normalizzazione del metabolismo glicidico da parte di questo ormone.

Per quanto riguarda l'azione della DPT si possono più particolarmente prendere in considerazione i due seguenti possibili meccanismi:

1° Apporto diretto di radicali fosforici dalla DPT all'ATP secondo il seguente equilibrio reversibile:

$$ATP + MPT \rightleftarrows ADP + DPT$$

(M.P.T. = monofosfotiamina;
A.D.P. = adenosindifosfato)

2° Sintesi dell'ATP per l'energia che si libera in seguito alla decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico secondo il seguente schema:

$$I)\quad CH_3CO\cdot COOH + HO-P(OH)=O + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow$$

$$\rightarrow CH_3COO-P(OH)=O + CO_2 + H_2O$$

Reazione catalizzata dalla DPT.

$$II)\quad CH_3COO-P(OH)=O - ADP \rightarrow CH_3COOH - ATP$$

Sono in corso ricerche per confermare i meccanismi prospettati.

E. Cutolo e Noris Siliprandi

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Roma, il 25 agosto 1951.

Summary

The labile phosphate (P_{ATP}) of the liver of alloxan diabetic rats is lower than that of normal rats. Both insulin and diphosphothiamine administration bring the P_{ATP} content of the liver of diabetic rats back to normal values.

Suggestions are made as to the probable mechanism of action.

Triosephosphates and Pyruvic Acid Intermediates in Fermentations of Pentoses by Living Cells of *Clostridium acetobutylicum*

The fermentation of pentoses, according to the theories generally adopted, may take place in one of two different ways:

(*a*) by fission between the carbons 2 and 3 of pentoses with formation of glycolaldehyde and glyceraldehyde or their phosphorilated derivatives[1];

(*b*) by oxydative decarboxylation yielding tetroses and trioses[2].

As indirect evidence in support to the first hypothesis, there are the recent experimental results of Rappoport *et al.*[3] and Lampen *et al.*[4] obtained from the fermentation of 1-arabinose-1-C^{14} and *d*-xylose-1-C^{14} by *Lactobacillus pentoaceticus*.

This bacterium converts both the pentoses, almost quantitatively, into acetic and lactic acids in equi-

1 N. Siliprandi, Acta Vitaminologica *4*, 249 (1950).

2 V. R. Potter, G. A. Le Page e H. L. Klug, J. Biol. Chem. *175*, 619 (1948).

3 La difosfotiamina ci è stata gentilmente fornita dalla Ditta Cutolo di Napoli.

4 A. Moschini, C. r. Soc. Biol. *111*, 668 (1932). – Th. Cahn e J. Houget, C. r. Acad. Sci. Paris *203*, 354 (1936). – V. Baccari, Boll. Soc. it. Biol. Sper. *25*, 356 (1949).

1 E. B. Fred, W. H. Peterson, and A. J. Davenport, J. Biol. Chem. *39*, 347 (1919); *42*, 175 (1920); *53*, 111 (1922).—I. B. van der Lek (Dissertation, Delft 1930). – M. J. Johnson, W. H. Peterson, and E. B. Fred, J. Biol. Chem. *91*, 570 (1931).

2 F. Lipmann, Nature *138*, 588 (1936).—O. Warburg and W. Christian, Biochem. Z. *292*, 287 (1937).—F. Dickens, Biochem. J. *32*, 1626, 1645 (1938).

3 D. A. Rappoport, H. A. Barker, and W. Z. Assid, Arch. Biochem. Biophys. *31*, 326 (1951).

4 J. O. Lampen, H. Gest, and J. C. Sowden, J. Bact. *61*, 97 (1951).

molecular yields. In the experiments with pentoses labelled in C-1, all radioactive atoms were found in the methyl carbon of acetic acid and not in the carbons of lactic acid. This result proves that the methyl- and carboxyl-groups of acetic acid derive respectively from carbons 1 and 2 of arabinose or xylose. According to the authors mentioned above[1], the conversion of carbons 1 and 2 of pentoses into methyl- and carboxyl-groups respectively, suggests that a ketopentose or a similar phosphorylated derivative is formed as an intermediate.

If the fission occurs between carbons 2 and 3, the intermediate products should be glycol- and glyceral-aldehydes.

From bacterial cell-free preparations, Racker[2] has found that triosephosphates are intermediates in the breakdown of pentose-5-phosphate, and this author was able to accomplish the condensation of triosephosphates with glycolaldehyde in the presence of aldolase of rabbit muscle.

The synthesis of ribose-5-phosphate was obtained by Marmur and Schlenk[3] from glycolaldehydephosphate and fructose 1-6-diphosphate as source of triose.

The problem of the first split of pentoses has been studied by us using phenylhydrazine oxalate (= PO) as trapping agent in fermentations of xylose and arabinose with living cells of *Clostridium acetobutylicum*. In our experiments we were able to fix triosephosphates and pyruvic acid, but we were unable to identify glycolaldehyde as phenylhydrazone[4] or glyoxal-osazone. We cannot, therefore, definitely assert whether glycolaldehyde is or is not an intermediate product in this fermentation, or whether this product is, in some particular form, hardly recognisable or detectable in the midst of oily products in the ether extracts of the medium.

The fixation of trioses and pyruvic acid as yet not isolated from bacterial fermentations of pentoses by living cells , is in agreement with the hypothesis that the C-3 moiety of pentoses is fermented via the normal way of hexoses. It is also supported by the fixation of the same intermediates from fermentations of glucose[5] and by the isolation of phosphoglyceric acid from fermentation of arabinose by dried cells of *Propionibacterium pentosaceum*[6].

Acetaldehyde was not trapped either in fermentations of glucose or in fermentations of pentoses, and therefore it is most probable that this product is not an intermediate in butyl alcohol fermentation.

Experimental Results

The preparation of experiment was the same as in a preceding paper[2]: *Clostridium acetobutylicum* was grown in 2500 ml of McDaniel's medium containing 2% of glucose and 50 ml of growth factors (yeast and liver autolysate). After 12 hours of incubation, the cells were harvested by means of a Sharples centrifuge, washed and immediately suspended in 1000 ml of the same medium at 1% of 1-arabinose or *d*-xylose; arabinose is shown to be better. The medium was made anaerobic by sweeping out the air with CO_2. The PO salt was added in two hours in three portions of 0·4 g each dissolved in 50 ml of distilled water containing 0·2 g of Na_2HPO_4. After 12–15 hours incubation, the medium was centrifuged and the clear liquid analysed for fixed products according to the preceding papers[1].

Triosephosphates were converted into methylglyoxal-2,4-dinitrophenylhydrazone:

m. p.	Calculated N%	Found
298°	25·93	25·85

Amount produced: 0·1–0·15 g per mille.

Pyruvic acid was isolated as phenylhydrazone by continuous ether extraction of the medium concentrated 1:3:

m. p.	Calculated N%	Found
188°	15·73	15·87

Amount produced: 0·1–0·2 g per mille.

Acetaldehyde: no acetaldehyde was found in the distillate from the medium of pyruvic acid added for freeing acetaldehyde from phenylhydrazine[2].

The author's thanks are due to S. A. Distillerie Agricole di Tresigallo for their support of this work.

V. Bolcato, M. E. Scevola, and M. A. Tisselli

Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Pavia, August 17, 1951.

Riassunto

Da fermentazioni dello xilosio e dell'arabinosio con cellule vive di *Clostridium acetobutylicum* è stato possibile isolare i triosofosfati e l'acido piruvico. Il risultato depone a favore dell'ipotesi che la metà a C-3 dei pentosi venga demolita secondo lo schema di Meyerhof.

[1] D. A. Rappoport, H. A. Barker, and W. Z. Assid, Arch. Biochem. Biophys. *31*, 326 (1951).—J. O. Lampen, H. Gest, and J. C. Sowden, J. Bact. *61*, 97 (1951).

[2] E. Racker, Federation Proc. *7*, 180 (1948).

[3] J. Marmur and F. Schlenk, Arch. Biochem. Biophys. *31*, 154 (1951).

[4] H. O. L. Fischer and C. Taube, Ber. Dtsch. chem. Ges. *59*, 851 (1926).

[5] V. Bolcato, M. E. Scevola, and G. F. Bettinetti, Arch. Biochem. *29*, 291 (1950).

[6] H. A. Barker and F. Lipmann, J. Biol. Chem. *179*, 247 (1949).

[1] V. Bolcato, M. E. Scevola, and G. F. Bettinetti, Arch. Biochem. *29*, 291 (1950).—V. Bolcato, M. E. Scevola, and G. C. Bussi, Naturwiss. *38*, 236 (1951).

[2] Since this paper has been submitted for publication, a work of R. Kaushal, P. Jowett, and T. K. Walker, Nature *167*, 949 (1951) on the isolation of glycolaldehyde in the fermentation of pentoses by *Acetobacter acetigenum* is appeared.

Utilisation du citrate par *Escherichia coli*

Escherichia coli est généralement considéré comme une bactérie ne pouvant utiliser le citrate comme source d'énergie. Cette propriété sert d'ailleurs de test pour la différenciation des bactéries coliformes.

Tout récemment, Vaughn[1] et ses collaborateurs ont montré que *Escherichia coli* peut cependant utiliser le citrate pour sa croissance à condition d'ajouter au milieu de culture un autre substrat (glucose, fructose, peptone, etc.).

Il était intéressant de rechercher si *Escherichia coli* cultivé dans ces conditions pouvait acquérir la faculté d'utiliser ensuite le citrate, sans autre source de carbone pour la respiration et la fermentation.

Nos expériences ont été faites avec des bactéries non proliférantes: *Escherichia coli* (souche M) est cultivé en

[1] R. H. Vaughn, J. T. Osborn, G. T. Wedding, J. Tabacnik, C. G. Beisel et T. Braxton, J. Bacteriol. *60*, 119 (1950).

Tableau I

Chaque cupule de Warburg contient: 0,5 cm³ de substrat (citrate et α-cétoglutarate M/400, succinate M/60, pyruvate M/30 concentration finale); 1 cm³ de suspension bactérienne et complété à 2,5 cm³ avec du tampon phosphate M/15 à pH 6,8. 0,2 cm³ de NaOH à 20% dans le logement central pour absorber le CO_2. Le substrat est ajouté après 10 min d'équilibration à la température de 37°C. Le QO_2 est calculé pour les dernières 60 min. La consommation d'oxygène endogène est défalquée de ces chiffres. Consommation d'oxygène en mm³. Temps en minutes.

Substrat		10	20	40	60	80	100	Poids sec de bactéries	QO_2	Inhibition %	Citrate disparu
Bactéries cultivées sur milieu Koser + glucose + citrate	citrate *a**		0	9	24	37	53	3,4	13		138γ
	citrate *b*		5	21	38	45	61	2,2	18		168γ
	citrate *a* + malonate M/25 conc. fin.	3	8	17	46	58		3,4	14	0	
	α-cétoglutarate	39	52,5	60	75	90		2,25	33		
	succinate	32	58	116	198	238	286	2,25	76		
	pyruvate	37	83	176	320	386		2,25	135		
	pyruvate + citrate *a*	35	80	172	319	383		2,25	135		
	glucose	44	96	189	340	404		2,25	137		
	glucose + citrate *a*	44	97	188	339	406		2,25	138		
Bactéries cultivées sur milieu Koser + glucose	citrate	0	0	0	0	0		3,4	0		0
	succinate	30	57	117	192	228		2,3	74		
	pyruvate	38	85	177	325	390		2,3	132		
	glucose	44	100	193	346	409		2,3	135		

* Les expériences marquées *a* ont été faites en même temps.

aérobiose, d'une part sur milieu Koser[1] contenant le glucose à 1% comme seul substrat carboné, d'autre part sur ce même milieu, glucosé à 0,1% auquel on a ajouté du citrate (0,2%). La préparation de la suspension bactérienne a été décrite précédemment[2]. La consommation d'oxygène a été mesurée dans l'appareil de Warburg et l'activité déshydrogénasique par la technique de Thunberg. Le dosage du citrate a été fait par la méthode de Perlman, Lardy et Johnson[3].

Les concentrations optima en substrat utilisées dans les expériences ont été préalablement déterminées et sont indiquées dans le tableau.

Les résultats résumés dans le tableau I montrent que le citrate est attaqué en aérobiose, seulement lorsque les bactéries ont été cultivées en présence de ce substrat.

La consommation d'oxygène en présence de citrate varie entre 50 et 80% de la quantité d'oxygène théorique nécessaire pour la combustion complète du citrate.

En anaérobiose également, seules les bactéries cultivées en présence de citrate sont capables de le dégrader, mais avec un dégagement gazeux négligeable.

Il ressort du tableau II que seules les bactéries cultivées sur le citrate possèdent une activité déshydrogénasique vis-à-vis de ce substrat. On peut donc penser à première vue que l'iso-citrico-déshydrogénase intervient dans l'oxydation du citrate.

Des résultats analogues, mais moins constants, ont été obtenus avec une suspension de bactéries non proliférantes provenant d'une culture sur milieu Koser non citraté mais laissée en contact avec citrate + glucose 16 heures à 37°C.

[1] S. A. Koser, J. Bacteriol. *8*, 493 (1923).

[2] E. Aubel, M. Grunberg-Manago et J. Szulmajster, Biochem. Biophys. Acta *3*, 442 (1949).

[3] D. Perlman, H. A. Lardy et M. J. Johnson, *Manometric Technique* (Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minn., 1900).

Ces expériences montrent que dans le cas de *Escherichia coli*, comme pour *Aerobacter aerogenes*[1], la dégradation du citrate en aérobiose et anaérobiose dépend d'une adaptation. Cette adaptation peut éventuellement, comme pour *Pseudomonas aeruginosa*[2], consister en un changement de la perméabilité cellulaire ou en la formation d'un enzyme adaptatif. Dans le cas où les bactéries peuvent utiliser le citrate, le problème de la pénétration de ce substrat est éliminé. On peut alors se demander si le glucose ou le citrate lui-même se dégradent suivant le cycle de Krebs.

Tableau II
Activité déshydrogénasique

0,5 cm³ de suspension bactérienne (500 γ de poids sec), 0,5 cm³ de bleu méthylène M/2000 concentration finale et complété à 2,5 cm³ avec du tampon phosphate M/15 à pH 6,8. Temps de décoloration en minutes.

Bactéries cultivées sur glucose + citrate		Bactéries cultivées sur glucose seulement
Bactéries	non décolorées	non décolorées
Bactéries + citrate *a*	13	non décolorées
Bactéries + citrate *b*	15	non décolorées

Or, les résultats du tableau I montrent que la dégradation du glucose par les bactéries même adaptées au citrate ne semble pas se faire par le cycle tricarboxylique. Le QO_2 du glucose, succinate et pyruvate est incomparablement plus élevé que celui du citrate et identique à celui obtenu avec les bactéries non adaptées. Lorsqu'on ajoute du citrate (à faible concentration, M/4000) soit

[1] M. Deffner et W. Franke, Liebigs Ann. Chem. *541*, 85 (1939).

[2] J. J. R. Campbell et F. N. Stokes, J. Biol. Chem. *190*, 853 (1951).

au glucose, soit au pyruvate, on n'observe aucune catalyse. De plus, en comparant les QO_2 d'α-cétoglutarate, succinate et pyruvate à celui du citrate, il est difficile d'admettre ce cycle, même pour la dégradation du citrate. Cette hypothèse est encore appuyée par le fait que le malonate, qui inhibe l'oxydation du succinate par *Escherichia coli*, est sans action sur celle du citrate. Mais la preuve définitive de la non-existence d'un cycle tricarboxylique dans *Escherichia coli utilisant le citrate* ne pourra être apportée que lorsqu'on connaîtra tous les produits intermédiaires formés au cours de la dégradation de ce substrat.

Nous remercions Monsieur le Professeur E. Aubel pour l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à notre travail.

J. Szulmajster, Marianne Grunberg-Manago et Colette Delavier

Institut de biologie physico-chimique, Paris, le 10 octobre 1951.

Summary

The utilisation of citrate by *Escherichia coli* depends on adaptation. Even adapted bacteria do not seem to split glucose by way of the tricarboxylic cycle.

Ersatz von β-Indolyl-Essigsäure im β-Karotin-Test durch Vitamin E (DL-α-Tocopherol) und Vitamin K (Roche 1–6722)

Der β-Karotin-Test als qualitatives Nachweisverfahren für Wuchsstoffe

Eine Reihe bekannter Prüfverfahren, wie zum Beispiel der Avenatest, erlauben es, β-Indolyl-Essigsäure (Heteroauxin) auf biologischem Wege nachzuweisen. Eine neue Methode zur qualitativen Bestimmung von Wuchsstoffen stellt der β-Karotin-Test dar, der bei Untersuchungen über die Wirkung von Karotinoiden auf die Pollenkeimung von *Cyclamen persicum* Mill. aufgefunden wurde[1].

β-Karotin hemmt bis zu Verdünnungen von 10^{-6} Gewichtsteilen die Keimung von Zyklamenblütenstaub. Der hemmende Einfluß des β-Karotins kann durch die Zugabe von Heteroauxin aufgehoben und in eine Förderwirkung umgewandelt werden. Dieser Effekt der β-Indolyl-Essigsäure ist um so auffälliger, als diese Substanz für sich allein im geprüften Konzentrationsbereich von 0,001 mg/l bis 1000 mg/l keine Wirkung auf die Keimung von Zyklamenpollen ausübt, was im Widerspruch zu Feststellungen früherer Autoren steht, die bei Untersuchungen an Pollen anderer Pflanzenarten einen stimulierenden Einfluß des Heteroauxins nachweisen konnten[2].

Die Versuchstechnik soll in einer späteren Arbeit beschrieben werden; es sei nur darauf hingewiesen, daß zur Prüfung von fett- und wasserlöslichen Stoffen verschiedene Verfahren entwickelt wurden.

Die Prüfung von Vitamin E und Vitamin K im β-Karotin-Test

Vitamin E wurde viermal, Vitamin K zweimal im β-Karotin-Test untersucht. Im folgenden sind die Resultate je eines Versuches wiedergegeben; außerdem wird zum Vergleich ein Versuch mit Heteroauxin angeführt.

Der β-Karotin-Test umfaßt drei Kontroll- und eine Versuchsserie. In der ersten Kontrollserie (als Kontrolle I bezeichnet) wird die Keimfähigkeit des verwendeten Pollens unter den gewählten Versuchsbedingungen bestimmt; in Kontrolle II untersucht man die Testsubstanz für sich allein auf ihre Wirkung in der Pollenkeimung; Kontrolle III prüft die angewendete Lösung von β-Karotin auf ihre hemmende Wirkung. In der Versuchsserie werden die Lösungen der Testsubstanz und des β-Karotins im gewünschten Mischungsverhältnis kombiniert.

Die Versuchsergebnisse wurden nach dem *t*-Test von R. A. Fisher statistisch bearbeitet[1].

Bei dem Versuch mit *β-Indol-Essigsäure* handelt es sich um die Modellreaktion für den β-Karotin-Test; unter dem Einfluß von Heteroauxin wird die Hemmwirkung des β-Karotins aufgehoben und in einen fördernden Einfluß umgewandelt, wobei β-Indolyl-Essigsäure allein die Keimung von Zyklamenpollen nicht beeinflußt.

DL-α-Tocopherol wirkt als Hemmstoff auf die Keimung von Zyklamenpollen. Aus Vorversuchen ergab sich, daß bei Verdünnung von $1:10^6$ die Wirkungsschwelle noch nicht erreicht war. Bringt man Vitamin E mit β-Karotin zusammen, so liegt die Keimrate beträchtlich über den Werten der entsprechenden Kontrollen; die partielle Aufhebung der Hemmung des β-Karotins durch Vitamin E ist mit einer Wahrscheinlichkeit von $P \ll 0{,}001$ gesichert.

Vitamin K wirkt in der untersuchten Konzentration von 1:200 für sich allein indifferent auf die Keimung von Zyklamenpollen, vermag jedoch wie das Heteroauxin den hemmenden Einfluß des β-Karotins in eine Förderwirkung umzuwandeln. Um eine Zerstörung des Vitamins K durch Licht zu verhindern, wurden die Versuche in verdunkelten Thermostaten durchgeführt.

β-Karotin wurde mir vom Chemischen Institut der Universität Zürich, Vitamin E und Vitamin K von der Firma F. Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Beiden Stellen spreche ich meinen verbindlichen Dank aus.

F. H. Schwarzenbach

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich, den 28. Oktober 1951.

Résumé

Le carotène β empêche la germination des grains de pollen de *Cyclamen persicum* Mill. Il est possible de transformer cet effet en une stimulation en ajoutant β-indole-acétique-acide (concentration 50 mg/l). La substance elle-même n'a aucune influence sur la germination du pollen.

Cet effet nous permet de déterminer des auxines qualitativement (test du carotène β). Par cette méthode on a prouvé que la vitamine E (DL-α-tocophérole) et la vitamine K (Roche 1-6722) peuvent remplacer IAA. La substance DL-α-tocophérole empêche la germination du pollen de *Cyclamen persicum*, la vitamine K n'a aucune influence.

[1] F. H. Schwarzenbach, Helv. chim. acta *34*, 1064 (1951).

[2] Tsung-Le Loo und Tsung-Chen Hwang, Amer. J. Botany *31*, 356 (1944).

[1] Vgl. A. Linder, *Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure* (Verlag Birkhäuser, Basel 1948 und 1951).

Erklärung der in den Tabellen verwendeten Symbole:

n	Anzahl der parallelen Einzelversuche pro Serie. In jedem Einzelversuch wurden 6×50 Pollenkörner ausgezählt.
Prozent	Keimrate, als arithmetisches Mittel aus den n Einzelversuchen bestimmt.
I,H,F,	Symbole zur Bezeichnung der Wirkung: I = Indifferenz, H = Hemmung, F = Förderung.
F,H)**	Abweichung statistisch stark gesichert, $0{,}01 \geqslant P > 0{,}001$.
F,H)***	Abweichung statistisch sehr stark gesichert, $P \leqslant 0{,}001$ *β-Indolyl-Essigsäure.*

	n	Prozent	Vergleich mit Kontrolle		
			I	II	III
Kontrolle I: Keimfähigkeit	9	21,59			
Kontrolle II: Heteroauxin 50 mg/l	8	23,42	I		
Kontrolle III: β-Karotin 1:1000	8	13,34	H***	H***	
Versuch: Heteroauxin + β-Karotin, Lösungen gemischt im Verhältnis 1:1	9	26,70	F**	F**	F***

DL-α-*Tocopherol (Vitamin E)*

	n	Prozent	Vergleich mit Kontrolle		
			I	II	III
Kontrolle I: Keimfähigkeit	6	18,39			
Kontrolle II: Vitamin E 1:2000	8	5,42	H***		
Kontrolle III: β-Karotin 1:2000	8	5,54	H***		
Versuch: Vitamin E + β-Karotin, Lösungen gemischt im Verhältnis 1:1	8	12,83	H***	F***	F***

Vitamin K (Präparat Roche 1–6722)

	n	Prozent	Vergleich mit Kontrolle		
			I	II	III
Kontrolle I: Keimfähigkeit	8	14,00			
Kontrolle II: Vitamin K 1:200	8	14,00	I		
Kontrolle III: β-Karotin 1:2000	7	7,19	H***	H***	
Versuch: Vitamin K + β-Karotin, Lösungen gemischt im Verhältnis 1:1	8	19,04	F**	F**	F***

The Pigment Granules of the Egg and Embryo of the Sea-Urchin *Paracentrotus lividus*

Previous observations have provided evidence that the carotenoid pigments of the egg of the sea-urchin *Paracentrotus lividus* are subject to changes during early development, thus suggesting that they may be involved in some morphogenetic process[1]. Since in the egg and in the cells of the embryo the pigments are located in small granules, it seemed worth while to try and get an insight into their chemical composition.

It has already been observed[2] that the carotenoids of the egg of *Paracentrotus* cannot be extracted with petroleum ether unless the eggs are first treated with alcohol. This observation has led to the suggestion that the carotenoids in the granules must be conjugated. The results of the analyses described in this paper show that the granules consist of a chromoprotein of a rather complex composition.

The pigment granules of eggs and embryos were isolated from homogenates in 1·5 M sucrose in 0·02 M Na-citrate. When the homogenates were centrifuged at high speed (using the high-speed attachement of the Int. Refrigerated Centrifuge) the pigment granules, together with fat, yolk granules and mitochondria, formed a thick red pellet on top of the homogenate. The pellet was easily collected with a spatula, resuspended in 1·5 M sucrose and recentrifuged. After a second washing, the pellet was taken up in 0·25 M sucrose in which the granules dissolved. A further centrifugation at high speed resulted in the separation of a clear supernatant (in order to get rid of the free fats in suspension some distilled water was layered on top of the solution before centrifugation) and a small sediment consisting of mitochondria, some unidentified granules and some pigment granules. Indeed it has constantly been noted that there is a fraction of pigment granules which does not dissolve under such conditions. All attempts to bring them into solution have so far failed. This seems to suggest that there are at least two different categories of granules in the egg. This point will be the subject of further consideration. The solution of the pigment granules in sucrose was dialysed against distilled water or buffer and submitted to analysis. All the operations so far described were carried out in a cold room at + 3°C.

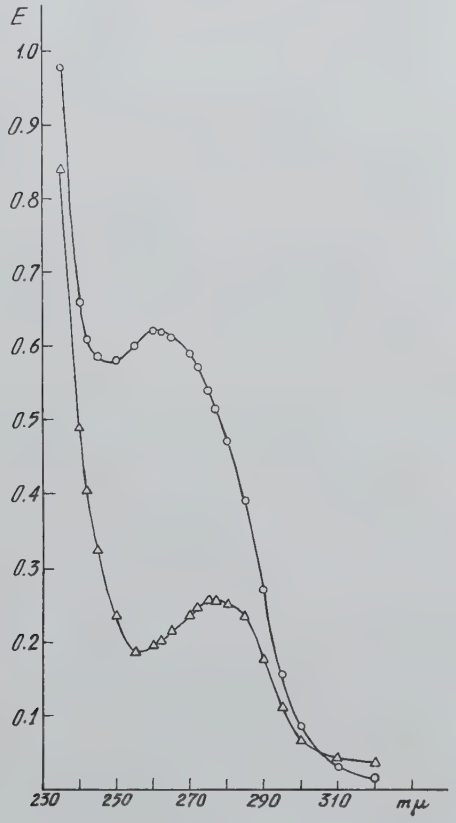
The solution of the pigment granules was frozen-dried before deing submitted to chemical analysis. This showed that about 30% of the dry weight consists of material extractable with 3:1 hot alcohol-ether at 70°C.

[1] A. Monroy, A. Monroy Oddo, and M. De Nicola, Exper. Cell. Res. (in press).

[2] M. De Nicola and A. Monroy Oddo (in preparation).

The extract includes carotenoids and phospholipids: indeed it contains 0·14% P. The delipidated material contains 10% N, 8·5% carbohydrates, and still 0·2% P. As no nucleic acid is present in such preparations, this residual P can be explained as being either strongly bound phospholipids or phosphoprotein-P. Paper chromatography has shown a complete assortment of amino acids.

The fact that no nucleic acid was present in our preparations seems to rule out the possibility of a contamination with mitochondria or microsomes.



Ultraviolet absorption spectrum of the chromoprotein of the pigment granules of unfertilized eggs (▵—▵) and of late blastulas (○—○) of *Paracentrotus lividus*.

The electrophoretic analysis of the granules in solution in phosphate buffer at pH 7·4 shows two main components and a third small one having mobilities of $u = -10$, $-4{\cdot}5$, and $-2{\cdot}9 \times 10^5/\mathrm{cm}^2/\mathrm{V/s}$. We cannot say at present whether the pigment is uniformly distributed in the three components, although there is some indication that the distribution may be unequal.

The fractional precipitation, using the salting out method of Derrien[1] (using $AmSO_4$ and estimating the amount of proteins in the supernatant from the absorption at 275 mμ), agrees with the results of the electrophoresis, showing the presence of three fractions with precipitation points at 60%, 70%, and 75% saturation of $AmSO_4$.

The same results were obtained with granules prepared from early stages of development and up to the early blastula stage. However, at about the time when migration of the primary mesenchyme takes place, the preparations appear to contain some nucleic acid. A comparison between the U.V. absorption spectrum of two preparations, one from unfertilized eggs and one from late blastula, shows this fact quite distinctly (Fig.). It is possible that the nucleic acid is a contamination, although the constancy of its quantity in different preparations (about 0·7% of nucleic acid P) may suggest that it is present as an integral part of the composition of the granules. The analysis shows that it is ribose nucleic acid, and that rules out a contamination with nuclear material. However, further analyses will clear up this important point.

Finally we might add that the chromoprotein in solution exhibits a type of reversible denaturation similar to that known for other proteins conjugated with carotenoids (Ovoverdin[1], Crustacyanin[2]): that is, the orange-red colour of our chromoprotein in solution in phosphate buffer at pH 7·4 turns to yellow when heated up to 85° C for 3—10 minutes and then, when the preparation is quickly cooled down, the colour returns to orange-red.

We wish to thank Dr. H. J. Bielig for interesting discussions.

Alberto Monroy and Marina De Nicola

Department of Physiology, Zoological Station, Naples, and Centre of Biology of the C.N.R., October 1, 1951.

Zusammenfassung

Die Pigmentkörnchen aus dem Ei von *Paracentrotus lividus* bestehen aus einem Chromoproteid. Mit Erreichen des Blastulastadiums ist in den Körnchen auch Nukleinsäure enthalten.

[1] K. G. Stern and K. Salomon, J. Biol. Chem. *122*, 461 (1938).
[2] G. Wald *et al.*, Biol. Bull. *95*, 249 (1948).

Changes in Water Diuresis and Vasopressin Inactivation in Mice Fed on Protein Deficient Diets

It has been suggested by several authors (literature reviewed by Eversole, Birnie, and Gaunt[1] and Ralli[2], that retention of water following liver damage is due, at least, in part to a decreased inactivation of the posterior pituitary antidiuretic hormone by damaged liver tissue. Pronounced depression of water diuresis has also been observed in animals kept on protein deficient diets (Dicker, Heller, and Hewer[3], Dicker[4]) and in patients suffering from hunger oedema (Gopalan[5]). There is ample evidence to show that the liver in such deficiency conditions may not be normal. It seemed of interest therefore to investigate whether the livers of protein deficient animals inactivate antidiuretic hormone at the normal rate, and secondly whether the fatty changes frequently found in the livers of such animals have a bearing on the impairment of water diuresis or on changes in the rate of inactivation of vasopressin.

[1] W. J. Eversole, J. H. Birnie, and R. Gaunt, Endocrinology *45*, 378 (1949).
[2] E. P. Ralli, S. H. Leslie, G. H. Stueck, and B. Laken, Amer. J. Med. *11*, 157 (1951).
[3] S. E. Dicker, H. Heller, and T. F. Hewer, Brit. J. Exper. Path. *27*, 158 (1946).
[4] S. E. Dicker, Biochem. J. *46*, 53 (1950).
[5] C. Gopalan, Lancet *258*, 304 (1950).

The experimental animals used were mice which were kept on various protein deficient diets. It could be shown that they developed signs of "protein deficiency" (loss of weight, anorexia, decrease of plasma proteins, fatty infiltration in the liver) much more rapidly than rats. In addition such animals excreted a standard water load at a lower rate than normals after only 6 to 7 days on the deficient diets: For example in a series of mice kept on a diet poor in protein and choline (= diet BB; see DICKER[1]) the mean volume of urine 90 min after water administration was only 17·5 per cent of that of the control series. When adequate amounts of choline were added to this diet (= diet BC) the mean urine volume rose to 47·4 per cent of that of the controls. A protein deficient vegetable diet (= TT) containing ample choline (DICKER, HELLER, and HEWER[2]), given to a third group of mice, lowered the mean urine volume excreted during 90 min to 33·2 per cent of the normal.

To study vasopressin inactivation, homogenates of mouse liver mixed with a standard dose of vasopressin and phosphate buffer of pH 6·5 were incubated at 37°C for 30 min. Rats to which water had been administered were injected intraperitonealy with the incubation mixtures and the antidiuretic effect compared with that of known doses of vasopressin. Expressed as percentage of the mean urine volume at 90 min of controls injected with an incubation mixture containing normal mouse liver, the results obtained with livers from animals on the protein deficient diets were as follows:

BB for 7 days = 73·7 per cent,
BB for 10 days = 61·5 per cent,
BC for 7 days = 81·2 per cent,
TT for 10 days = 60·6 per cent.

In other words, it would appear that more antidiuretic material remained active in the liver homogenates from protein deficient animals with the result that the inhibition of water diuresis in the test rats was more pronounced.

Fatty changes in livers of animals kept on the protein deficient diet were investigated by histological and by chemical methods. The histological results are summarized in the table. The chemical estimation of total liver lipids were in reasonable agreement with the histological findings. There would appear to be no parallelism between the results of the diuresis and inactivation experiments, and the intensity of fatty changes: Mice kept on diet TT for 10 days for instance showed a pronounced inhibition of water diuresis and their livers inactivated vasopressin less efficiently, even though no fatty changes could be found in the liver.

Assessment by histological methods of the intensity of fatty changes in the liver of mice on protein deficient diets. The degree of fatty vacuolation is recorded as 0, +, ++, +++ or ++++.

Days on Diet	Control Diet	Diet BB	Diet BC	Diet TT
1	0	+	0	0
2 to 3	0	+ + +	+ +	+
4 to 5	0	+ + + +	+ + +	+
6 to 7	0	+ + + +	no data	+ +
8	0	+ + +	+	+
10	0	+ +	+	0

[1] S. E. DICKER, Biochem. J. *46*, 53 (1950).

In view of the findings of LESLIE and RALLI[1] and of DICKER[2] that the urine of rats fed on a protein deficient diet contained amounts of antidiuretic activity which increased the longer the animals remained on the experimental diet, it would be tempting to associate the lack of the renal response to water in protein deficient mice with the decreased ability of their liver to inactivate vasopressin. However, such an association can at present, for several reasons, be regarded as no more than an inviting possibility.

J. H. BIRNIE, K. E. BLACKMORE, and H. HELLER

Department of Pharmacology, University of Bristol, October 22, 1951.

Zusammenfassung

Mäuse, die auf eiweißarme Kost gesetzt werden, zeigen wenige Tage später eine bedeutende Abnahme ihrer Fähigkeit zur Wasserdiurese. Die Leber solcher Tiere inaktiviert Vasopressin langsamer als Leberbrei von Kontrollen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen Befunden ist fraglich. Je nach der Zusammensetzung der eiweißarmen Kost (Cholingehalt, Kalorienwert) und der Versuchsdauer traten bei den Versuchstieren verschiedene Grade von Leberverfettung auf. Diuresehemmung und Verlangsamung der Vasopressininaktivierung konnten jedoch auch in Tieren nachgewiesen werden, deren Leber keinen erhöhten Fettgehalt aufwies.

[1] S. H. LESLIE and E. P. RALLI, Endocrinology *41*, 1 (1947).
[2] S. E. DICKER, Biochem. J. *46*, 53 (1950).

Antidiuretic Action of Small Doses of Enteramine Extracts in the Rat

Extracts of Posterior Salivary Glands of Octopus vulgaris

Alcohol and acetone extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* and *Eledone moschata* inhibit diuresis in rats and in various other mammals, including humans. The antidiuretic action is due to enteramine.

Results obtained in dogs and rats with massive doses of salivary extract were reported in previous communications[1].

The purpose of present researches was to establish:

(*a*) the smallest dose of salivary extract of *Octopus vulgaris* still active on the diuresis of hydrated rats;

(*b*) the mechanism of action of small doses of salivary extract. In this connection it was important, above all, to confirm what had already been observed in dogs when using large doses of the same material.

The experiments were carried out on 560 adult albino rats of both sexes, weighing from 130 to 250 g. A first load of tepid tap water (2·5 cm^3/100 g) was administered in the morning by stomach tube to fasting animals. After three hours a second water load (5 cm^3/100 g) was given and, at the same time, the rats were injected subcutaneously with 1 cm^3/100 g distilled water, in which, besides the salivary material (lacking, of course, in the controls), 50 mg sodium thiosulphate (500 mg/kg) and 5 mg *p*-aminohippuric acid (PAH, 50 mg/kg) were dissolved.

[1] V. ERSPAMER and A. OTTOLENGHI, Exper. *6*, 428 (1950), *7*, 191 (1951).

Table I

	Percent excretion after				
	1	1½	2	3	7 hours
Water					
Controls	37·9	57·2	68·7	76·7	110·0
Vulgaris 0·002 g/100 g	29·7	50·7	61·9	74·2	103·0
Vulgaris 0·01 g/100 g	25·6	45·9	58·2	71·2	101·7
Vulgaris 0·1 g/100 g	19·4	36·7	48·9	62·8	97·5
Thiosulphate					
Controls	31·3	36·1	38·2	39·4	40·9
Vulgaris 0·002 g/100 g	28·4	35·6	37·2	39·1	40·0
Vulgaris 0·01 g/100 g	26·3	35·0	37·2	39·1	40·3
Vulgaris 0·1 g/100 g	23·4	33·3	36·6	38·2	39·6
PAH					
Controls	62·3	70·7	74·6	77·2	80·0
Vulgaris 0·002 g/100 g	55·8	70·1	73·7	76·2	78·7
Vulgaris 0·01 g/100 g	51·4	67·3	71·9	76·7	79·3
Vulgaris 0·1 g/100 g	44·7	63·1	69·7	73·5	76·3

The animals were placed, in groups of four, into diuresis cages, and urine collected into graduated cylinders and measured, at regular intervals, up to the 7th hour. Thiosulphate and PAH were estimated in samples of urine by the usual methods.

Altogether 140 animals were employed as controls; three other groups, of 140 animals each, were injected with the extract corresponding to 0·002 g, 0·01 g, and 0·1 g fresh salivary tissue/100 g body weight.

At this point it seems worth remembering that the salivary extract obtained from 1 g fresh tissue leaves a dry residue of 40—50 mg, including fats, and that the acute toxicity of the salivary material is remarkably low, corresponding, by subcutaneous route, to about 10 g fresh tissue/100 g rat.

It follows that the doses of extract injected by us represent only 1/5000, 1/1000 and 1/100 of the lethal dose.

The results of our experiments are set down in tables I and II.

Table I gives the percent excretion of administered water and test substances (thiosulphate and PAH); table II, clearly inferred from the preceding, shows the relative percent excretion of water and test substances when considering as 100 the excretion of the control group.

The experimental methods used in the present investigation (PAH and thiosulphate in the blood were not tested) allow us to measure only the urine flow. As regards glomerular filtration rate and effective renal plasma flow, we have to be satisfied with relative information resulting from the comparison of PAH and thiosulphate excretion values in treated and in control animals.

In the work *in extenso*, results obtained with our procedure will be subjected to criticism and treated statistically. Provisionally we may consider acceptable, also from a quantitative point of view, the information given by the test substances when the amount of such substances excreted during the whole observation period by rats injected with the salivary extract do not differ more than 10—20% from that excreted by control animals.

Even proceeding cautiously, the following conclusions may be drawn from the data reported in the tables:

(1) A significant inhibition of diuresis may be observed in rats after injecting subcutaneously the extract obtained from as little as 2 mg fresh salivary tissue per 100 g body weight. Researches in progress

Table II

	Relative percent excretion (controls = 100) after				
	1	1½	2	3	7 hours
Water					
Vulgaris 0·002 g/100 g	78·3	88·6	90·1	96·7	93·6
Vulgaris 0·01 g/100 g	67·5	80·2	84·7	92·8	92·4
Vulgaris 0·1 g/100 g	51·2	64·2	71·2	81·9	88·6
Thiosulfate					
Vulgaris 0·002 g/100 g	90·7	98·6	97·4	99·2	97·8
Vulgaris 0·01 g/100 g	84·0	96·9	97·4	99·2	98·5
Vulgaris 0·1 g/100 g	74·8	92·2	95·8	96·9	96·8
PAH					
Vulgaris 0·002 g/100 g	89·6	99·1	98·8	98·7	98·4
Vulgaris 0·01 g/100 g	82·5	95·2	96·4	99·3	99·1
Vulgaris 0·1 g/100 g	71·7	89·2	93·4	95·2	95·4

having proved that the amount of pure enteramine contained in the fresh salivary tissue is about $1^0/_{00}$, one may deduce that 2 μg enteramine/100 g rat are certainly effective.

(2) The reduction of diuresis is accompanied by a sure, though less marked reduction of thiosulphate excretion and by a similar reduction of PAH excretion.

The decrease of thiosulphate excretion demonstrates that enteramine antidiuresis must be considered, at least to the greater part, as a consequence of a diminished glomerular filtration, which in its turn is clearly caused by a drop in intraglomerular hydrostatic pressure.

(3) At our dosage, the salivary extract is quite ineffective on the systemic blood pressure of the rat. The fall of intraglomerular pressure and the slowing of blood flow through the intertubular capillary network, as indicated by the lowering of PAH excretion, can therefore only be explained by a constriction of the *afferent vascular bed* of the glomerulus.

Researches now in progress aim to ascertain with greater accuracy the point of attack of enteramine and the modifications in intrarenal circulation caused by the substance. At present it is enough to have gained confirmation that small doses of salivary material act on rats by a mechanism exactly similar to that observed in dogs after administration of massive doses.

It must be pointed out that salivary extracts of *Octopus vulgaris* by no means represent the most suitable material for studying the antidiuretic action of enteramine.

Indeed they contain, besides enteramine, also tyramine and octopamine (= *l-nor*synephrine), both possessing a marked diuretic activity due to their systemic hypertensive action and their constricting action on the *efferent* vascular section of the glomerulus.

Results achieved in the present investigation have been conclusively confirmed using extracts of *Discoglossus pictus* skin, which is just as rich in enteramine as salivary extracts of *Octopus vulgaris* but free of disturbing substances, as well as using pure enteramine and synthetic enteramine-like products.

V. Erspamer and A. Ottolenghi

Pharmacological Institute, University of Bari, September 3, 1951.

Zusammenfassung

Die kleinste Dosis der Speicheldrüsenextrakte von *Octopus vulgaris*, die bei der Ratte noch sicher diuresehemmend wirkt, entspricht 2 mg frischem Gewebe pro 100 g Tier.

Die antidiuretische Wirkung ist einer Drosselung des afferenten Gefäßsystems des Glomerulus zuzuschreiben, mit nachfolgender Verminderung des hydrostatischen intraglomerularen Druckes und der Durchströmung des intertubularen Kapillarnetzes.

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Grating Spectrum of Iron

By A. Gatterer

(Specola Vaticana, Città del Vaticano 1951) ($25.–)

Der Leiter des spektrochemischen Laboratoriums der Vatikansternwarte hat mit der Neuherausgabe dieses Atlasses des Eisenspektrums die vatikanischen Prachtwerke, welche die optischen Spektren zur Darstellung bringen, um eines vermehrt, das, indem es das Standardspektrum enthält, von ganz besonderem Nutzen ist. Auf 45 Originalphotoabzügen von 23×30 cm Größe ist das Eisenspektrum mit der konstanten Dispersion von 0,7 Å/mm nach Aufnahmen mit einem 21-foot-Gitterspektrographen von Jarell-Ash Co. dargestellt, und zwar das Bogenspektrum im Bereich $\lambda\lambda$ 8900–2150 und das Funkenspektrum zwischen $\lambda\lambda$ 5300–2150, ferner im Gebiet $\lambda\lambda$ 8900–5300 das Spektrum des Zirkonbogens, dessen zahlreiche Linien und ZrO-Banden in glücklicher Weise die Lücken des Eisenspektrums überbrücken. Die Wahl von Zirkon wird mit dem astrophysikalischen Interesse dieses Elementes begründet. Auf zwei Tafeln ist mit der Dispersion von 2 Å/mm das Neonspektrum zusammen mit den Eisenlinien im Bereich $\lambda\lambda$ 8900–5900 wiedergegeben.

Sämtliche Linien sind auf das sorgfältigste mit 6- bis 7-ziffrigen Wellenlängenangaben, kritisch nach den besten Quellen gesichtet, angeschrieben. Das Werk ist aufs beste geeignet, den Spektroskopikern, welche mit den modernen Spektrographen arbeiten, die rasche Identifizierung von Spektrallinien ohne mühsame Ausmessung zu ermöglichen, und es ist sicherlich dank der beispiellosen Sorgfalt, mit der es hergestellt ist, schlechthin unübertreffbar. E. Miescher

Einführung in die chemische Thermodynamik

Von Gustav Kortüm

303 Seiten mit 85 Abbildungen
(Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1949)
(Kart. DM 17.80, geb. DM 20.–, Leinen DM 22.–)

Das neue Werk des bekannten Autors zeigt zunächst den «klassischen» Aufbau eines Thermodynamik-Buches; in sieben Kapiteln werden behandelt: Definitionen und Grundbegriffe, die thermische Zustandsgleichung, der 1. Hauptsatz, der 2. Hauptsatz, das thermische Gleichgewicht, der Nernstsche Wärmesatz, die Thermodynamik der Phasengrenzflächen.

Bemerkenswert und sehr erfreulich ist die Art der Darstellung im einzelnen; sehr konsequent wird der Leitgedanke durchgeführt, nämlich den Leser mit der begrifflichen und mathematischen Technik der thermodynamischen Behandlung chemischer Probleme vertraut zu machen. Erreicht wird diese Geschlossenheit durch Verzicht auf alles Beiwerk; mit Recht wird ein übermäßiges Eingehen auf Grundlagenfragen, werden mathematische Weiterungen, ebenso größere Abschweifungen in das Gebiet der molekularen Deutung vermieden. Nach Durcharbeiten des Werkes sollte der Leser, insbesondere der Studierende der Chemie, imstande

sein, ohne besondere Schwierigkeiten die einschlägigen Originalarbeiten zu lesen und zu verstehen – dies insbesondere deshalb, weil die Nomenklatur erfreulicherweise alle Extravaganzen vermeidet und dem heutigen mehr oder weniger angenommenen Gebrauche folgt –. Darüber hinaus dürfte es dem Leser aber auch möglich sein, unter Beiziehung des Buches selbst thermodynamische Probleme der Chemie in Angriff zu nehmen.

F. Grün

Comparative Animal Physiology

By C. L. Prosser

888 pp. (W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1950) (63/-)

A modern comprehensive book on comparative animal physiology is certainly very welcome as it fills a gap in the physiological literature. As it is pointed out in the preface, the book is meant for the advanced student as well as for the investigator, as a source of information and references. Without doubt this aim has been entirely accomplished. While being concise and easy to read, the most recent aspects and developments of the problems are outlined and discussed. It has therefore the added merit of being a stimulating book.

The book is the result of the cooperation of five physiologists, each one dealing with a group of separate subjects: Water; Inorganic ions; Protein specificity; Nutrition; Feeding and digestion; Nitrogen excretion; Respiratory functions of body fluids; Temperature; Circulation of body fluids; Muscle and electric organs; Amoeboid movements; Nervous system (C. L. Prosser); Respiration and metabolism (D. W. Bishop); Photoreception; Chemoreception; Phonoreception (T. L. Jahn and W. J. Wulff); Mechano- and equilibrium reception (W. J. Wulff and C. L. Prosser); Cilia; Trichocysts and Nematocysts; Bioluminescence; Chromatophores and colour change; Endocrine mechanisms (F. A. Brown, Jr.).

Considering all these good qualities, it seems desirable that some inexactitudes (e. g. to include the frog *Discoglossus* among the Prochordates, p. 290 and Table 48, and to consider Echinochrome as an iron-containing respiratory pigment, p. 292) should be corrected in the next edition.

A. Monroy

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

EXPLICATIONES

Zur Klimaänderung der Gegenwart

Über die in den letzten Jahrzehnten, insbesondere seit 1920, sich bemerkbar machende Erwärmung des Klimas besteht eine umfangreiche Literatur. Eine Zusammenstellung der klimatischen Faktoren, nebst Literaturverzeichnis gibt uns Lysgaard[1]; weitere Angaben, insbesondere auf botanischem Gebiete, ebenfalls nebst Bibliographie, stellte der Verfasser dieser Mitteilung zusammen[2]. Anschließend an den VII. Botanischen Kongreß in Stockholm im Juli 1950 nahm Verfasser an der von Dr. Arnborg geführten Exkursion durch das Nadelwaldgebiet in Schweden teil, die einen Querschnitt von Gästrikland nördlich Stockholm bis Abisko im Lappland bot. Obwohl Verfasser schon mehrfach Lappland bereist hatte, zuerst vor dem ersten Weltkriege, also vor Eintritt der sichtbaren Klimaänderung, fuhr er erneut dahin, um vor allem den Einfluß der Klimaänderung auf die Wälder an der polaren Waldgrenze zu beobachten. Dies gelang ihm im Muddus-Nationalpark unweit von Gällivara in Lappland und bei Abisko. Die hier gemachten Beobachtungen bestätigten vollauf die von finnischen Forschern im früheren Gebiet von Petsamo und von russischen Forschern gemachten Untersuchungen (siehe die Arbeiten des Verfassers).

Schon Renvall[3] hatte 1912 darauf hingewiesen, daß die Kiefer an der polaren Waldgrenze nur einmal im Laufe von 100 Jahren reife Samen hervorbringt, daß aber weiter südlich die Samenjahre häufiger auftreten. Nekrasowa[1] zeigte, daß auf der Halbinsel Kola die Fichte alle 6–7 Jahre Samen reift, je Hektar jedoch nur 100–150 000 Samen den Boden erreichen. Dies ist jedenfalls eine Folge des unweit der polaren Waldgrenze herrschenden, für die Verjüngung der Bäume ungünstigen Klimas. Wird dieses wärmer, so müssen die Samenjahre häufiger auftreten, dies bestätigen auch Beobachtungen von Hustich, Aario und anderen im nördlichen Finnland und im nördlichen Norwegen. Beobachtungen in dieser Richtung haben vor solchen an der alpinen Waldgrenze den Vorzug, daß die polare Waldgrenze vom Menschen bedeutend weniger beeinflußt ist – es kommen eigentlich nur die Nomaden mit ihren Rentieren in Betracht – als die letztere, die für die Zwecke des Sennereibetriebes stark herabgedrückt ist.

Da die polare Waldgrenze als ein Produkt der bisher herrschenden klimatischen Bedingungen angesehen werden kann und daher äußerst labil ist, so genügen kleine Schwankungen des Klimas, um eine Verschiebung in der einen oder anderen Richtung hin hervorzurufen.

Allerdings haben wir es im schwedischen Lappland, bzw. in der Gegend von Gällivara und Abisko nicht mit der eigentlichen polaren Waldgrenze zu tun, die ja weiter nördlich verläuft, sondern mit einer alpinen Waldgrenze, liegt doch Abisko in mehr als 400 m Höhe, doch ist hier im Norden kein wesentlicher Unterschied zwischen polarer und alpiner Waldgrenze zu beobachten, und weiter nördlich fallen beide zusammen. Der Grad der menschlichen Beeinflussung ist hier aber ein und derselbe; eine Depression der Waldgrenze für die Zwecke des Sennereibetriebes und der Viehwirtschaft, wie wir sie in den Alpen beobachten, kommt in Lappland nicht in Frage.

[1] L. Lysgaard, Folia Geographica Danica, V. København, H. Hagerup (1949).

[2] C. Regel, Österr. Bot. Z. *96*, 369 (1949); Ber. Geobot. Forsch.-Inst. Rübel, Zürich 1949, 11 (1950).

[3] R. Renvall, *Die periodischen Erscheinungen der Reproduktion der Kiefer an der polaren Waldgrenze* (Helsingfors 1912). (Diss.).

[1] T. P. Nekrasowa, Reprodukcija jeli na Kolskom Sewere. Botan. J. XXXIII, Nr. 2, 239. (Moskwa-Leningrad 1948).

Die Nadelwälder des südlichen Teiles der Nadelwaldzone, wie zum Beispiel bei Stockholm, enthalten Bäume aller Altersklassen. Neben alten Kiefern sieht man solche mittleren Alters, kleine und kleinste Bäume, so daß der Wald von den vielen Bäumen dicht ist. Im Gegensatz hierzu stehen die Nadelwälder Lapplands, in denen man nur ausgewachsene Bäume sieht und dann den Jungwuchs am Boden, während die dazwischen wachsenden Altersklassen fehlen. Jedenfalls fällt der nordische Nadelwald dadurch auf, daß man zwischen seinen Stämmen eine weite Sicht hat, denn diese wird nicht durch die Bäume verschiedensten Alters verdeckt. Diese eigentümliche Erscheinung ist eine Folge der erwähnten Samenjahre. Wird das Klima wärmer und treten infolgedessen die Samenjahre häufiger auf, so muß der nordische Wald allmählich den Aufbau eines südlicheren Waldes mit Bäumen verschiedenster Altersklassen aufweisen. Können wir diesen Vorgang in Lappland beobachten?

Es kam uns vor allem darauf an, festzustellen, inwieweit die Samenjahre der Kiefer bei Gällivara und bei Abisko häufiger auftreten als früher. Im Muddus-Nationalpark bei Gällivara wurde auf trockenen Böden mehrfach reicher Jungwuchs der Kiefer verschiedener Jahresklassen beobachtet. Folgende Feststellungen wurden gemacht:

a) Wald aus Birken und Kiefern *(Pinus silvestris)* mit Heidekraut (*Calluna vulgaris*) und Krähenbeere (*Empetrum*) in der Feldschicht. Der Jungwuchs der Kiefer besteht hier aus den verschiedenen Altersklassen und ist 1–1,5 m hoch.

b) Ebensolcher Wald mit Kiefern-Jungwuchs aller Altersklassen, darunter auch einige junge Fichten.

c) Ebensolcher Wald, alte Kiefern von 350 Jahren, mit Brandspuren von vor 175 Jahren, darunter stellenweise dichter Jungwuchs aller Jahresklassen, 6–10 Kiefern auf Flächen von 4 m². Samenjahre beim Jungwuchs alle 6–7 Jahre vorhanden. Ein besonders reiches Samenjahr war das Jahr 1946.

d) Kiefernwald auf trockenem Boden auf Anhöhe. Hier wurden bis zu 430 Jahre alte Kiefern festgestellt, die nächste Generation war 280 Jahre alt, dann wieder 125 Jahre alt, dazu kamen einige 110 Jahre alte Fichten und einige 50 Jahre alten Kiefern. Schließlich gab es Jungwuchs mehrerer Jahresklassen der letzten Jahre.

e) Kiefernwald mit dichtem Unterwuchs aus Schwarzbeeren (*Vaccinium Myrtillus*). Der Jungwuchs der Kiefer ist reichlich und umfaßt verschiedene Jahrgänge.

Auffallend ist ferner, daß sich dieser Jungwuchs nur auf die Kiefer bezieht, nicht aber auf die Fichte, die keinen oder aber einen nur spärlichen Jungwuchs aufweist, im Gegensatz zur Halbinsel Kola, wo Verfasser, allerdings noch vor Eintritt der Klimaänderung, stellenweise einen dichten Jungwuchs der Fichte beobachten konnte[1]. Die Erklärung liegt darin, daß das jetzt wärmere und zugleich trockenere Klima vor allem der Kiefer zugute kommt, zuletzt aber der Fichte, deren Optimum in einem kälteren und feuchteren Klima liegt, wie es bis vor kurzem herrschte. Dies ist auch von anderen Forschern beobachtet worden.

Abisko liegt schon in der Stufe des Birkenwaldes, der in den Gebirgen des Nordens die Grenze gegen die alpine Stufe bildet. Nur einige wenige Kieferngruppen wachsen inmitten des Birkenwaldes unweit der Touristenstation. Hier wurden folgende Aufzeichnungen gemacht, die die stärkere Verjüngung des Baumes in den letzten Dezennien charakterisieren.

a) Alte Kiefer im Birkenwalde, stark mit Zapfen besetzt, die aus zwei nacheinanderfolgenden Jahren stammen.

b) Heide mit Krähenbeeren (*Empetrum nigrum*) bewachsen, dazwischen zerstreut einige Kiefern wachsend, 15 Jahre alt, 10–12 Jahre alt und 8 Jahre alt.

c) Kieferngruppe im lichten Birkenwald. Kiefern 100–150 Jahre alt, einzelne auch bis zu 200 Jahre alt, darunter jüngere Kiefern, 45, 20–25, 15 und 4 Jahre alt. Stellenweise sind fünf Generationen innerhalb der letzten 15 Jahre zu beobachten.

Auch die Birke zeigt reichen Jungwuchs, sowohl bei Abisko als auch weiter an der oberen Waldgrenze bei Björkliden und bei Riksgränsen. Alle von Bäumen entblößten Flächen sind dicht mit jungen Birken bestanden; der Birkenwald erobert das Gebiet zurück, auf dem er vernichtet war, während dies früher Jahrzehnte dauerte und eine solche schnelle Rückeroberung nicht zu beobachten war. Dasselbe berichten auch finnische Forscher von der Fischerhalbinsel im früheren Gebiete von Petsamo.

Aus vorliegenden Beobachtungen, die diejenigen finnischer und norwegischer Forscher in anderen Gegenden des schwedischen, finnischen und norwegischen Lapplandes bestätigen, läßt sich ersehen, daß die Kiefer im Muddus-Nationalpark bei Gällivara und bei Abisko in den letzten Jahren häufig Samen getragen hat und daher Jungwuchs verschiedener Jahresklassen vorhanden ist, während ein solcher aus früheren Jahren nicht vorhanden ist und die Samenjahre nur selten vorkamen. In Abisko wurden junge Kiefern beobachtet, deren Jahresunterschiede nur 4–10 Jahre betrugen, woraus man auf ein häufiges Eintreten der Samenjahre hier in den letzten Dezennien schließen kann. Diese Beobachtungen bestätigen die Beobachtungen zahlreicher anderer Forscher und lassen sich in die Reihe übriger Beweise für eine Erwärmung des Klimas in den letzten Dezennien einreihen. Eine jede Klimaänderung bewirkt eine Verschiebung der den eurasiatischen Kontinent durchziehenden Landschaftszonen, der Tundra, des Nadelwaldes, des Laubwaldes, der Steppe, der Wüste nach Norden oder nach Süden hin. Wird das Klima, wie es jetzt der Fall ist, wärmer, so rückt die Zone des Nadelwaldes in die Tundra vor, indem die Samenjahre an der Waldgrenze häufiger auftreten als früher. Doch da diese Verschiebung der Zonen nicht nur die Verjüngung der Wälder beeinflußt, sondern alle Merkmale der betreffenden Zone, sowohl Pflanzen- und Tierwelt als auch die leblosen, wie zum Beispiel die Gletscher, so muß eine Untersuchung der Klimaänderung sich auf alle diese Merkmale zusammen erstrecken. Eine Zusammenstellung dieser Merkmale durch den Verfasser ist in Vorbereitung.

Was aber die Waldgrenze in Schwedisch-Lappland und das häufige Auftreten der Samenjahre anbelangt, so wäre deren eingehendere Untersuchung an Hand von Dauerprobeflächen, sowohl im Nationalpark von Muddus als auch in Abisko, wo eine Biologische Station besteht, wünschenswert.

C. Regel

Zürich, den 7. August 1951.

Résumé

L'auteur fait part de ses observations faites pendant l'excursion dans la région des forêts de la Suède septentrionale à la suite du Congrès international de botanique à Stockholm en 1950. Sous l'influence du climat devenu plus chaud les forêts à Muddus reverdissent et ont la tendence d'envahir la toundra, un fait observé par des savants finnois, norvégiens et russes.

[1] C. Regel: *Die Vegetationsverhältnisse der Halbinsel Kola*, Repert. Spec. nov. regni vegetabilis. Beiheft LXXXI (Verlag Prof. Dr. Fr. Fedde, Dahlem 1941).

STUDIORUM PROGRESSUS

Chemical Contributions to the Mechanism of the Biological Oxidation of Tryptophan[1]

By ARVID EK, HENRY KISSMAN, JAMES B. PATRICK, and BERNHARD WITKOP, Washington and Cambridge, U.S.A.

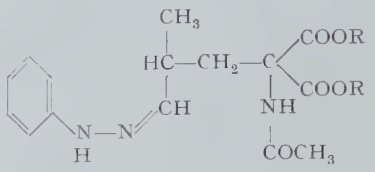
The *in vitro* oxidation of indole derivatives, such as indole[2] itself, methylketol[2], tetrahydrocarbazole[3], 2,3-cyclopentenoindole[4], 2,3-cycloheptenoindole[4], and other indoles[5] by the action of catalytically excited oxygen[6] or by autoxidation[7], by perbenzoic[8] or peracetic[9] acids and other oxidants[5] has been shown to lead through intermediate 3-hydroperoxy- or 3-hydroxyindolenine derivatives[10], the colorful chemistry of which has been demonstrated in several instances[11].

This course of oxidation was expounded in the conversion of the alkaloid cinchonamine into quinamine by the action of peracetic acid[12], a transformation that helped to settle the structural and phytochemical relationship of the two plant products.

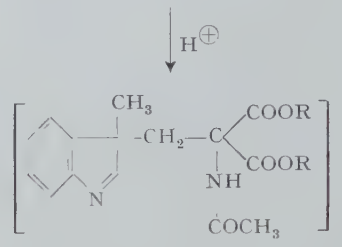
In the light of these facts it is not surprising that α-hydroxytryptophan (oxindolylalanine), III (first isolated from the hydrolysate of the toxic peptide phalloidine[13], then obtained from tryptophan by the action of peracetic acid[9] and by total synthesis[14]), originally postulated to be the first intermediate in the oxidative breakdown of tryptophan (KOTAKE, BUTENANDT), was shown not to be a normal intermediate by the important biochemical studies of KNOX and MEHLER[15], AMANO *et al.*[16], SAKAN and HAYAISHI[17], MASON and BERG[18].

The synthesis of the ACTUAL intermediate, viz. β-hydroxy-ψ-tryptophan (IVa, pag. 37) has been under investigation in these Institutes for some time. Although this aim has not been quite reached yet, some findings of interest were made.

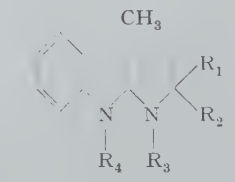
A. – β-Methyl- or β-hydroxyindolenines with an alanine side chain at pH < 6 undergo an internal acid-catalyzed condensation to yield derivatives of eseroline with alkyl or hydroxyl substituents in the angular position (C_{10}). Even acetylation of the primary amino group does not prevent this internal cyclization. Thus, it is impossible to synthesize β-methyl-ψ-tryptophan by the acid-catalyzed Fischer synthesis from the phenylhydrazone



XI



XII



XIIIa: $R_1 = R_2 = COOEt$, $R_3 = CH_3CO$, $R_4 = H$
XIIIb: $R_1 = R_2 = COOEt$, $R_3 = R_4 = CH_3CO$
XIIIc: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

XI of the compound resulting from the base-catalyzed addition of diethyl acetamidomalonate to α-methylacrolein[1]. Instead, one obtains derivatives of *bisnor*eseroline (XIIIc), such as XIIIa and XIIIb, compounds that open new synthetic routes into the eserine system and furnish new derivatives of medicinal interest[2].

B.—These internal condensation products, such as present in the alkaloid quinamine, are derivatives of hydroxyindolines, lack the reactive –N=C< element of indolenines (comparable to a keto group) and are, therefore, resistant to further oxidative attack. These findings are in accord with the fact that a pH > 6 is required for the breakdown of tryptophan (as such or in proteins)[3] by the peroxidase-oxidase system of

[1] The preparation of this preliminary report, reviewing material that appeared or will appear in the Journal of the American Chemical Society, was kindly suggested by Prof. L. RUZICKA.—*On the Mechanism of Oxidation* V, *vide* Papers III and IV in this series: J. Amer. Chem. Soc. (in press).—From the National Heart Institute, National Institutes of Health, Washington 14, D. C., and the Converse Memorial Laboratory of Harvard University, Cambridge 38, Massachusetts, U.S.A.

[2] B. WITKOP and J. B. PATRICK, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 713 (1951).

[3] B. WITKOP, ib. *72*, 614 (1950).

[4] J. B. PATRICK, M. ROSENBLUM, and B. WITKOP, Exper. *6*, 461 (1950); J. Amer. Chem. Soc. *73*, 2641 (1951).

[5] B. WITKOP (unpublished).

[6] B. WITKOP and J. B. PATRICK, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 2196 (1951).

[7] R. J. S. BEER, L. MCGRATH, and A. ROBERTSON, J. Chem. Soc. *2118*, 3283 (1950).

[8] B. WITKOP and H. FIEDLER, Ann. Chem. *558*, 91 (1947).

[9] B. WITKOP, ib. *558*, 98 (1947).

[10] B. WITKOP, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 1428 (1950).

[11] B. WITKOP and J. B. PATRICK, Exper. *6*, 183 (1950); J. Amer. Chem. Soc. *72*, 633 (1950); *73*, 1558, 2188 (1951).—S. G. P. PLANT and R. ROBINSON, Nature *165*, 36, 928 (1950).—S. G. P. PLANT and M. TOMLINSON, J. Chem. Soc. *1950*, 2127.

[12] B. WITKOP, ib. *72*, 2311 (1950).

[13] H. WIELAND and B. WITKOP, Ann. Chem. *543*, 171 (1940).

[14] M. KOTAKE, T. SAKAN, and T. MIWA, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 5085 (1950).—J. W. CORNFORTH, R. H. CORNFORTH, C. E. DALGLIESH, and A. NEUBERGER, Biochem. J. *48*, 591 (1951).

[15] W. E. KNOX and A. H. MEHLER, J. Biol. Chem. *187*, 419, 431 (1950).

[16] T. AMANO, M. TORII, and H. IRITANI, Med. J. Osaka Univ. *2*, 45 (1950).

[17] T. SAKAN and O. HAYAISHI, J. Biol. Chem. *186*, 177 (1950).

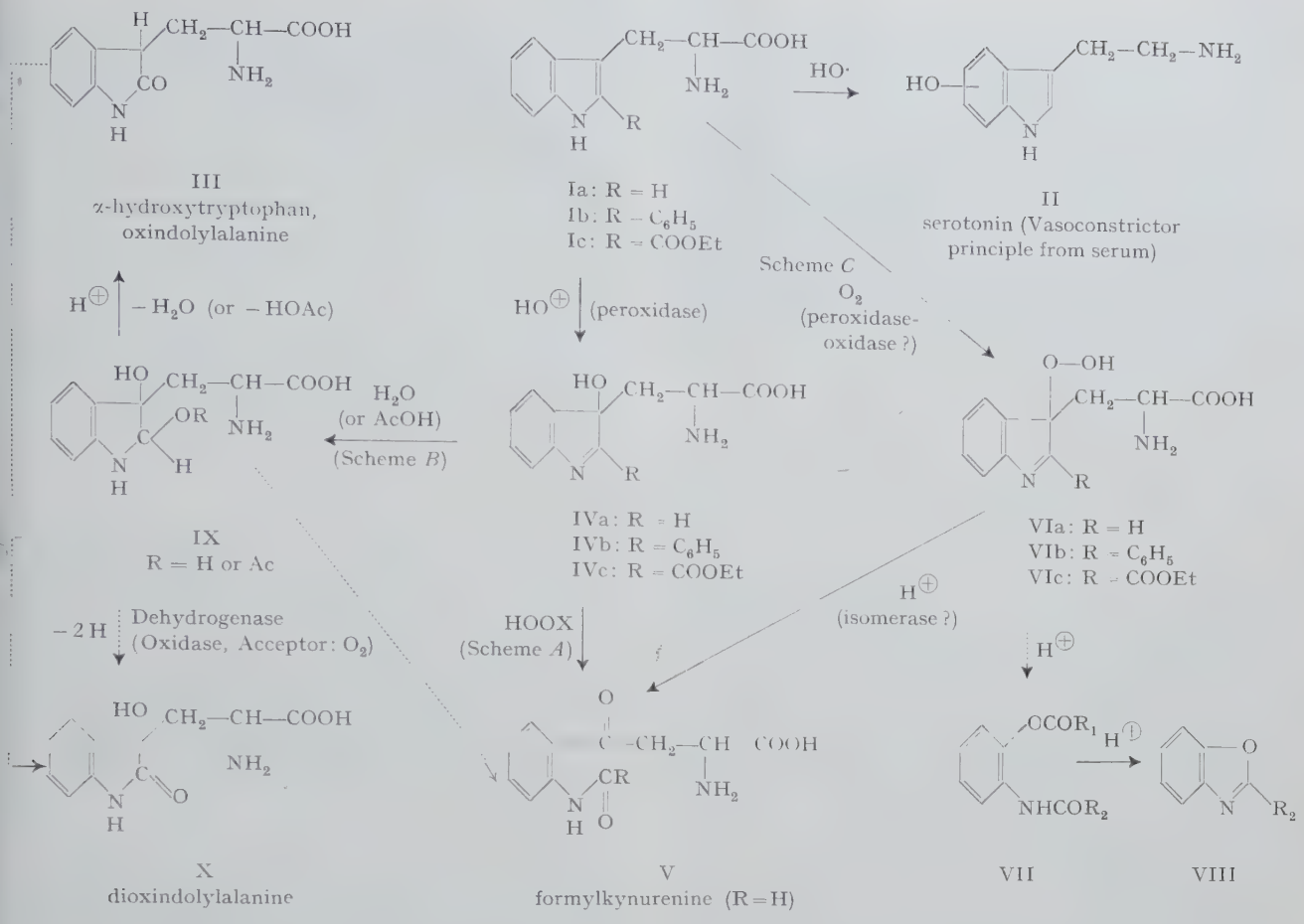
[18] M. MASON and C. P. BERG, ib. *188*, 783 (1951).

[1] Cf., D. T. WARNER and O. A. MOE, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 2586 (1949).

[2] B. WITKOP, R. K. HILL, and H. KISSMAN, unpublished.

[3] The absorption of oxygen by solutions of serum proteins observed under the influence of light and hematoporphyrins is largely due to the presence of *tryptophan* and *tyrosine:* D. T. HARRIS, Biochem. J. *20*, 280 (1926) and ref. [4]. Likewise, it has been known for 20 years that peroxidase (from milk) oxidizes just these two amino acids: K. A. C. ELLIOT, ib. *26*, 10 (1931). The formation of the diphenyl ether linkage in *thyroxine* from diiodotyrosine and possibly the iodination of tyrosine has lately been attributed also to the action of peroxidase. Thus, the role of peroxidase in animal cells, uncertain for such a long time, is gaining more and more biological significance.

[4] H. GAFFRON, Biochem. Z. *179*, 157 (1926).

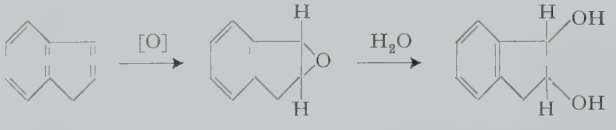


Tentative Correlation of the Breakdown Products Resulting from Tryptophan by Chemical or Biological Oxidation

Knox and Mehler[1] or by heavy metal-catalyzed (aut)-oxidation[2] or photooxidation with[3] or without photosensitizers[4].

C.—Formulae Ia–X give a reasonable scheme of the breakdown of tryptophan and tries to combine the enzymatic findings of Knox and Mehler[1] and of Neuberger and his school[5] with our chemical studies on the mechanism of oxidation in this series.

There are two principal pathways from β-hydroxy-ψ-tryptophan (IVa) to formylkynurenine (V). Scheme *B* starts out with the addition of water to give the glycolic intermediate IX[6]. However, this glycol IX is not likely to be the primary intermediate arising directly from tryptophan (Ia). Such a direct formation, it is true, would have an analogy in the autoxidation of indene (XIV) yielding (among other products) 2,3-oxidoindan (XV) and 2,3-dihydroxyindan (XVI)[1]. Yet indole (and its derivatives) is quite different in its chemical habitus from indene, and, if one wants to push the comparison, more like indone. In fact, it has proved impossible to prepare 2,3-oxidoindolines and where such structures have been postulated[2] revision[3] was necessary.



There still remained in the literature a number of indole epoxides such as XVIIa[4], XVIIb[5], and XVIIc[6],

[1] W. E. Knox and A. H. Mehler, J. Biol. Chem. *187*, 419, 431 1950).

[2] B. Witkop (unpublished).—K. A. Kuiken, C. M. Lyman, and F. Hale, J. Biol. Chem. *171*, 551 (1947).

[3] H. Gaffron, Biochem. Z. *179*, 157 (1926).

[4] F. Lieben, ib. *184*, 453 (1927).

[5] C. E. Dalgliesh, W. E. Knox, and A. Neuberger, Nature *168*, 20 (1951).

[6] W. E. Knox and A. H. Mehler, J. Biol. Chem. *187*, 419, 431 (1950).—C. E. Dalgliesh, W. E. Knox, and A. Neuberger, Nature *168*, 20 (1951).

[1] H. Hock and F. Depke, Ber. *84*, 122 (1951).

[2] R. Goutarel, M.-M. Janot, V. Prelog, and W. I. Taylor, Helv. chim. acta *33*, 150 (1950).

[3] B. Witkop, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 2311 (1950).

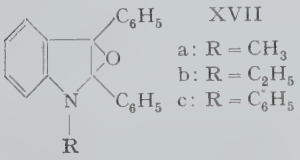
[4] M. Kohn and A. Ostersetzer, Monatshefte *34*, 787 (1913).—F. J. Myers and H. G. Lindwall, J. Amer. Chem. Soc. *60*, 2153 (1938).

[5] F. J. Myers and H. G. Lindwall, J. Amer. Chem. Soc. *60*, 2153 (1938).

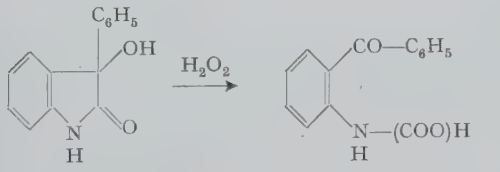
[6] R. Stollé, J. prakt. Chem. *135*, 345 (1932).—W. C. Sumpter, J. Amer. Chem. Soc. *64*, 1736 (1942).

which, however, turned out actually to be all indoxyl derivatives, XVIIIa, XVIIIb, and XVIIIc[1].

The glycolic intermediate IX[2] (corresponding to a hydrated ketone) would be a suitable substrate for a dehydrogenase (oxidase[3]) with oxygen serving as an acceptor, producing hydrogen peroxide. Dioxindolylalanine (X) would be the product of such a dehydrogenation. Whether there is another enzyme ("carboligase") catalyzing an inverse acyloin condensation, or whether there is possible a ring-chain transformation from X to formylkynurenine (V) may be left open at the moment. There is no chemical precedent for the existence of such a ring-chain tautomerism of dioxindole and its derivatives.

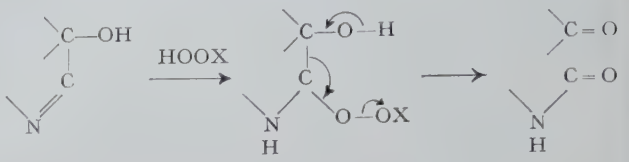


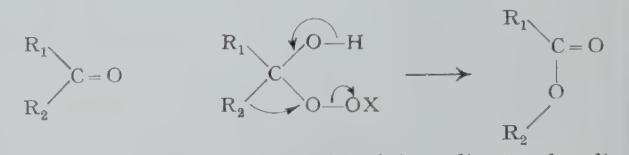
Dioxindole behaves more like a true acyloin giving isatin on mild oxidation[4] and requiring hydrogen peroxide for oxidative ring fission[5]:



The preservation of the formyl group in formylkynurenine V militates against oxidative ring opening, the absence of chemical precedents against ring-chain tautomerism.

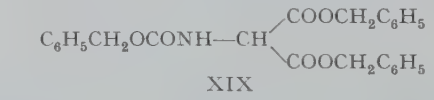
The stumbling block in this course of Scheme *B*, namely the breakage of $> C_2-C_3 >$, is avoided by assuming a direct glycolic cleavage by the action of the oxidase, comparable to other enzymatic ring openings, e.g. the formation of *cis,cis*-muconic acid from catechol by the action of pyrocatechase[6]. We have shown previously[1] that such a breakage occurs smoothly by the action of peracids on hydroxyindolenines in analogy to the formation of lactones from ketones. The two related reactions can be correlated in the following way (X = H, CH_3CO, C_6H_5CO, etc.):





To summarize. Scheme *B* involving direct glycolic cleavage of IX (rather than the formation of a dioxindole intermediate X) attractively accommodates the enzymatic requirements. Scheme *A* fulfills all chemical prerequisites, but does not take due account of the enzymatic conditions, viz. the presence of a dehydrogenase (oxidase[2]), the necessity of oxygen as a hydrogen acceptor, and the formation of hydrogen peroxide in the dehydrogenation.

D.—Since it proved difficult to halt oxidation of tryptophan (Ia) under alkaline conditions at an intermediate stage, substituents such as phenyl or carbethoxy were introduced into the 2-position (Ib and Ic) in order to block internal condensation and to allow of the use of acidic conditions in the oxidation reactions. The synthetic problem, involving four different functional groups in the case of Ic, was greatly helped by the use of



dibenzyl carbobenzyloxyaminomalonate (XIX)[3], a compound which should turn out to be very useful for many synthetic reactions, since all three benzyl groups can be removed in one single step by catalytic hydrogenation. It is then hoped that the intermediate IVc will, after saponification, lose carbon dioxide with the same ease as α-picolinic acid in a base-catalyzed decarboxylation reaction[4].

E.—The nature of the blocking group *R* (Ib, Ic) greatly affects the ease and rate of autoxidation of tryptophan (Ia) reminiscent of the influence of the ring size on the rate and course of autoxidation of homologous tricyclic indoles[5]. Accordingly, the possible rôle that a cyclic chelate complex of a suitable heavy metal (copper, cobalt, iron, etc.)[6] with Ia or IVa might have on the rate and course of this oxidation is being studied.

[1] B. Witkop and A. Ek, ib. (in press).

[2] The preparation of glycols from indoles offers certain difficulties. Osmium tetroxide forms very stable complexes with tryptophan: B. Helferich and F. Vorsatz, Z. physiol. Chem. *239*, 241 (1936). The reaction of N-acylindoles with hydrogen peroxide in tertiary butyl alcohol, now under investigation, seems to be more promising. The formation of atroxindol from skatol, or of oxindolylalanine (III) with peracetic acid proceeds through a glycolic intermediate (equivalent to IX) followed by acid-catalyzed loss of water (cf. Table I).

[3] W. E. Knox and A. H. Mehler, J. Biol. Chem. *187*, 419, 431 (1950).

[4] B. Klein, J. Amer. Chem. Soc. *63*, 1474 (1941).

[5] S. Inagaki, J. Pharm. Soc. Jap. *59*, 1 (1939); Chem. Abstr. *33*, 3790 (1939).—G. Jacini, Gazz. Chim. Ital. *72*, 510 (1942); *73*, 85 (1943).

[6] O. Hayaishi and K. Hashimoto, Med. J. Osaka University *2*, 33 (1950); cf. R. Y. Stanier and O. Hayaishi, The Bacterial Oxidation of Tryptophan, Science, *114*, 326 (1951); The Bacterial Oxidation of Tryptophan. III. Enzymatic Activities of Cell-Free Extracts from Bacteria Employing the Aromatic Pathway, J. Bacteriol, in press.—The example of catechol is not quite adequate: as an enediol its oxidation state is more comparable to dioxindole (cf. X). On the other hand, saturated glycols [e.g. 1,2-*trans*-dihydroxy-1,2-dihydroanthracene-1-glucuronic acid and the analogous glycols from naphthalene and phenanthrene, E. Boyland and G. Wolf, Biochem. J. *47*, 64 (1950)] do not undergo ring fission. This makes the formation of formylkynurenine (V) a unique biochemical reaction.

[1] B. Witkop and J. B. Patrick, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 2196 (1951).

[2] W. E. Knox and A. H. Mehler, J. Biol. Chem. *187*, 419, 431 (1950).

[3] B. Witkop and H. Kissman (unpublished).

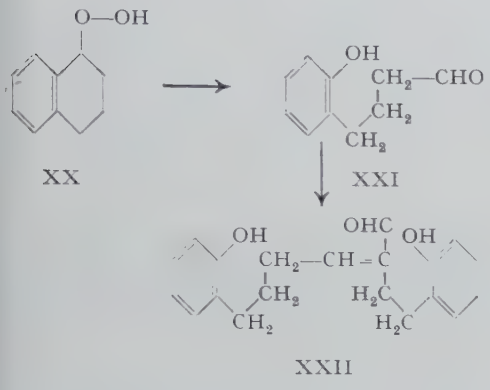
[4] Cf. B. R. Brown and Ll. Hammick, J. Chem. Soc., 659 (1949).

[5] J. B. Patrick, M. Rosenblum, and B. Witkop, Exper. *6*, 461 (1950); J. Amer. Chem. Soc. *73*, 2641 (1951).

[6] Copper and Cobalt (again in *alkaline* medium) in concentrations down to $5 \cdot 10^{-6}$ M catalyze still another reaction, viz. the tryptophanase reaction leading from tryptophan to indole and ammonia: E. A. Dawes and F. C. Happold, Nature *164*, 704 (1949).—F. C. Happold, Advances in Enzymology, *10*, 51 (1950).

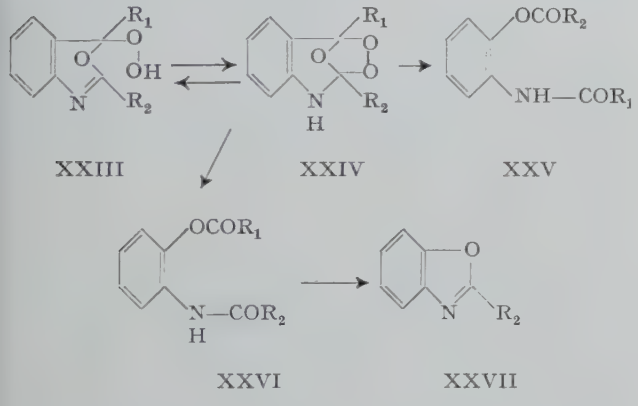
F.—The formation of hydroperoxides of type VI, so easily observed *in vitro*, might also occur *in vivo* (Table I, Scheme *C*). The ease of rearrangement, varying with the type of substituents in positions 2 and 3, into derivatives equivalent to formylkynurenine (V) has been demonstrated with model compounds[1]. A hydroperoxide-isomerase effecting the transformation from β-hydroperoxy-ψ-tryptophan (VIa) to formylkynurenine (V) would seem an attractive biological speculation apart from the possible mutagenic[2], cardiotonic[3], and carcinogenic[4] aspects of the intermediary hydroperoxide.

G.—The rearrangement of hydroperoxide intermediates equivalent to VI and in particular to VIb could also take a second course analogous to the acid-catalyzed rearrangement of tetralin hydroperoxide (XX) to the phenolic compounds XXI and XXII[5]. In fact, such a



XX XXI XXII

rearrangement was recently realized in the acid-catalyzed isomerization of the *ring-chain* tautomeric ozonide, XXIII ⇄ XXIV, to the *o*-diacylaminophenols (XXV, XXVI)[6].



XXIII XXIV XXV XXVI XXVII

[1] J. B. Patrick, M. Rosenblum, and B. Witkop, Exper. *6*, 461 (1950); J. Amer. Chem. Soc. *73*, 2641 (1951).—B. Witkop and J. B. Patrick, ib. *73*, 2196 (1951).

[2] A. Loveless, Nature *167*, 338 (1951).

[3] O. Krayer, R. P. Linstead, and D. Todd, J. Pharmacol. and Exp. Therap. *77*, 113 (1943).—O. Krayer, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *53*, 51 (1943).—J. Mita, Arch. of Exp. Path. Pharmacol. *104*, 276 (1924).—H. Richter, Arch. für exper. Path. Pharmakol. *194*, 362 (1940).—R. Mendez, J. Pharmacol. and Exper. Therap. *81*, 151 (1944).

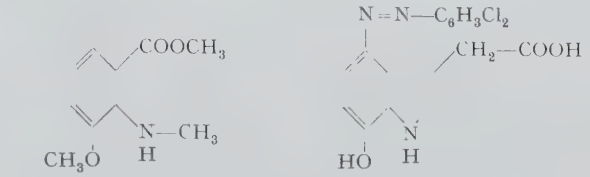
[4] H. F. Park, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 2248 (1947).

[5] M. S. Kharasch, Lecture before the Swiss Chemical Society, 15 February 1950, at Zürich, cf. Angewandte Chemie *62*, 292 (1950).

[6] B. Witkop and J. B. Patrick, J. Amer. Chem. Soc. (in press).

If derivatives of *o*-aminophenol[1] or benzoxazole[2] were to be found as normal or abnormal animal or bacterial metabolites, their origin would have to be considered by this scheme.

H.—The introduction of the phenolic hydroxyl group, present in the "cn+-compound" (3-hydroxykynurenine), 3-hydroxyanthranilic acid[3], xanthurenic acid and in methylated form in the plant alkaloid damascenine (XXVIII), has so far been assumed to occur at the kynurenine stage. Yet the coupling product of potassium dichlorophenyldiazonium sulfonate with a



XXVIII Damascenine XXIX

pathogenic indole breakdown product isolated from the urine of a patient with liver cancer[4], if correctly expressed by XXIX, would indicate that phenolic hydroxyindoles may be formed prior to the breakdown of the pyrrole ring. A more conclusive piece of evidence for this hitherto-neglected aspect of tryptophan metabolism is furnished by *serotonin* (II), the vasoconstrictor principle isolated from beef serum[5]. The synthesis of serotonin[6], now actively pursued in these Institutes, will show whether this oxidation product is an intermediate in the chain of reactions leading to xanthurenic acid or, in an alternate pathway, leading

[1] The antibiotic properties of *o*-aminophenol may be mentioned in this connection: M. Barber and G. A. D. Haslewood, Brit. Med. J., *1944*, 754.

[2] *o*-Aminophenol as a metabolite passes readily into benzoxazoles (cf. R. T. Williams, *Detoxication Mechanisms* [John Wiley & Sons, Inc., New York 1947], pp. 144, 149) similar to the conversion of XXVI to the benzoxazole XXVII.

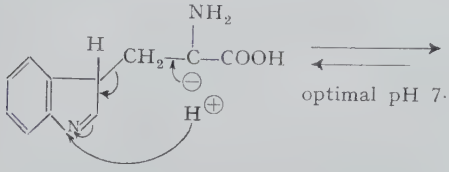
[3] The biological transformation of 3-hydroxyanthranilic acid into nicotinic acid need not be discussed here. It should be pointed out, however, that the formulation of this process according to C. Mentzer, D. Molho, and Y. berguer, Bull. Soc. Chim. France 782 (*1950*) is unlikely, since it involves the reduction of 6-hydroxynicotinic acid to nicotinic acid; a much more reasonable sequence of reactions is suggested by M. Guggenheim, *Die biogenen Amine* (S. Karger, Basel–New York 1950), p. 263.

[4] L. Hermanns and P. Sachs, Z. physiol. Chem. *114*, 79, 88 (1921); these coupling reactions with diazonium compounds have recently led R. J. Williams to the discovery of abnormal products in the urine of schizophrenic patients (Chem. Eng. News. *29*, 314 [1951]) and helped in recognizing the significance of individual metabolic patterns in human biochemistry (*cf.* American Chemical Society, 120th Meeting, Sept. 1951, Abstracts 6C).

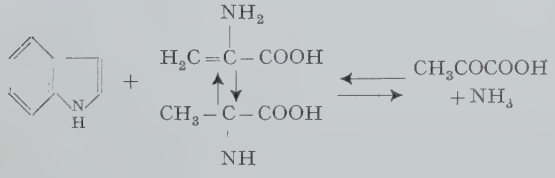
[5] M. M. Rapport, A. A. Green, and I. H. Page, Science *108*, 329 (1948).—M. M. Rapport, J. Biol. Chem. *180*, 961 (1949).

[6] Note added in proof.—According to a private communication from Dr. Irvine H. Page (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland 6, Ohio), 5-hydroxytryptamine, synthesized in the Abbott Laboratories (North Chicago, Illinois) by Dr. K. E. Hamlin (J. Am. Chem. Soc., in press), exhibits physical and pharmacological properties identical with those of serotonin. The final confirmation of identity is awaiting the direct comparison of the synthetic with the natural product.—The recent reports from the Cleveland group on the existence of another hypertension factor, produced in the brain region and possibly related to serotonin, are of interest in connection with our work on the synthesis of further isomers and derivatives of serotonin (B. Witkop and A. Ek, unpublished).

to 5-hydroxy-, 5,6-dihydroxyindoles and from there to compounds of melanin character[1]. It would be interesting indeed, if there were to be found a biological parallelism to the fact that *ionic oxidants* (involving OH^+) oxidize the pyrrole part of indole compounds, while certain radical oxidants (involving .OH) favor attack of the benzene ring. The position equivalent to a benzyl carbon, namely the methylene group of the alanine chain of tryptophan, has also been considered as a likely site for metal-catalyzed oxidation, a process for which radical mechanisms have been discussed[2]. A simpler and more obvious mechanism explaining the rupture of the tryptophan molecule into indole, pyruvic acid and ammonia is given in the following:



Tryptophan (*pseudo*-form)



indole α-aminoacrylic acid pyruvic acid + ammonia

The initial formation of an anion could equally well be formulated in a manner involving radical intermediates. This formulation would also account for the production of harman from tryptophan and ferric chloride[3]. Either the addition of tryptophan to aminoacrylic acid, or the condensation of the former with pyruvic acid, would lead to intermediates giving harman on oxidation and decarboxylation.

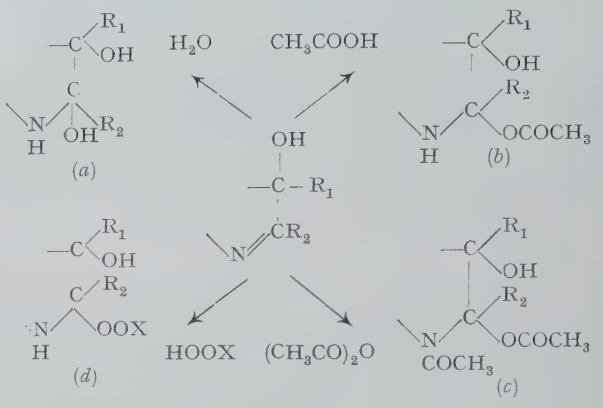
Acknowledgment: It is a pleasure to thank Drs. A. H. Mehler and O. Hayaishi for stimulating discussions.

Zusammenfassung

Die Oxydation von Indol-Derivaten einschließlich Tryptophan durch molekularen Sauerstoff, Autoxydation, Persäuren und Enzyme führt primär zu β-Hydroperoxy- und β-Hydroxy-ψ-indolen. Solche Hydroxyindolenine zeigen folgende charakteristische Reaktionen:

1. In saurem Medium gehen sie *inter*molekulare oder, falls geeignete Substituenten (zum Beispiel die Alanin-Seitenkette in Tryptophan) vorhanden sind, *intra*molekulare Kondensation ein zu Verbindungen vom Eserolin-Typus.

2. Sie addieren unter anderm Wasser (*a*), Essigsäure (*b*), Essigsäureanhydrid (*c*), Persäuren (*d*, X=Ac, Bz



usw.), Wasserstoffsuperoxyd (*d*, X=H) zu Produkten, die formal hydratisierten Ketonen (*a*), deren Mono- (*b*) und Ortho-Azetaten (*c*) sowie Ketonhydroperoxyden (*d*) entsprechen.

3. Die oxydative Ringspaltung, die über das Zwischenprodukt (*d*) erfolgt, ist ein Vorgang, welcher der Lactonbildung aus Ketonen mittels Persäuren und Wasserstoffperoxyd analog ist. Vom chemischen Standpunkt erklärt dieser Mechanismus den biologischen Abbau des Tryptophans zu Formylkynurenin zufriedenstellend.

4. Die Anlagerungsverbindungen von Wasser oder Essigsäure an β-Hydroxy-ψ-indole vom Typ (*a*) und (*b*) sind Glykole, die in saurer Lösung, falls Wasserabspaltung erfolgen kann (*a* R_2 = H), in Oxindole übergehen oder in alkalischem oder neutralem Medium möglicherweise oxydative Ringspaltung erleiden; ein Seitenweg zu Derivaten des Dioxindols ist möglich, würde aber nicht weiter zu Formylkynurenin führen. Die Bildung von Formylkynurenin aus Tryptophan nach Schema *B* würde den enzymatischen Versuchen von Knox und Mehler gerecht.

5. Als dritter Mechanismus (Schema *C* in der Übersicht auf Tafel I) für den biologischen Abbau des Tryptophans läßt sich ein β-Hydroperoxy-ψ-tryptophan nicht unbedingt ausschließen. Eine solche Verbindung könnte sich direkt zu Formylkynurenin umlagern.

Im Zusammenhang mit der Erörterung dieser Oxydationsmechanismen werden einige neue Beziehungen und Aspekte im Stoffwechsel des Tryptophans diskutiert.

[1] Cf. H. Burton, Chem. and Ind. 313 (1948).

[2] F. C. Happold, Advances in Enzymology *10*, 62 (1950).

[3] F. G. Hopkins and S. Cole, J. Physiol. *29*, 451 (1903).—R. Robinson, J. Chem. Soc., *115*, 968 (1919).

STUDIORUM PROGRESSUS

Zur Kenntnis der Mukopolysaccharide, insbesondere der Heparine

Von R. Marbet und A. Winterstein[1], Basel

Heparin, das physiologische gerinnungshemmende Agens des menschlichen und tierischen Organismus, verdankt seine Entdeckung den Arbeiten von McLean[2], der sich im Jahre 1916 mit der Isolierung von gerinnungsfördernden Lipoiden aus der Leber befaßte und hiebei auf einen gerinnungshemmenden Stoff stieß. Die Aufklärung der chemischen Natur des Heparins erfolgte auf einem langen Irrwege: Im Jahre 1924 korrigierte Howell[3] zunächst die ursprüngliche Auffassung, wonach das Heparin zu den Phosphatiden gezählt worden war. Er sprach es als phosphorfreie, stickstoffhaltige Kohlenhydratverbindung an. Die weitere Reinigung führte ihn zur Überzeugung, daß es sich um einen stickstofffreien Uronsäurekomplex handeln müsse[4]. Zu einer ähnlichen Auffassung kamen Fischer und Schmitz[5], welche im Jahre 1933 für Heparin die Formel $C_{18}H_{32}O_{17} \cdot 6H_2O$ aufstellten. Etwa zur gleichen Zeit faßten Charles und Scott das Heparin als eine stickstoffhaltige Verbindung auf, die aber keine Uronsäuren enthält.

Herrschte also bis 1933 vollkommene Unklarheit über die chemische Natur des Heparins, so brachten die Arbeiten von Jorpes[6] schon im Jahre 1935 die grundlegende Erkenntnis, daß Heparin aus Uronsäuren und Glukosamin aufgebaut und durch einen hohen Gehalt an Schwefelsäure ausgezeichnet ist, das heißt, daß Heparin zur Reihe der Mukopolysaccharide bzw. deren Schwefelsäureester zu rechnen ist. Jorpes[7] stellte die Bruttoformel $C_{14}H_{17}O_{20}NS_3Na_4$ zur Diskussion. Er wies auch schon auf die nahen chemischen Beziehungen zur Chondroitinschwefelsäure hin. Die Auffassung von Jorpes wurde in der Folge von verschiedenen Forschern, zum Beispiel Charles und Todd[8] sowie Reinert und Winterstein[9], bestätigt. Letztere Autoren stellten für das Heparin die Bruttoformel $C_{28}H_{37}O_{38}N_2S_5Na_7$ auf und kamen zur Erkenntnis, daß die Aktivität vom Vorhandensein der Schwefelsäurereste sowie von der Molekülgröße, das heißt von dem Polymerisationsgrad, abhängt. Im Jahre 1946 hat Wolfrom[10] die Uronsäure als Glukuronsäure identifiziert. Er stellte 1950[11] für Heparin die unten dargestellte Strukturformel auf. Nach den Untersuchungen von Snellmann[1], der für Heparin ein Molekulargewicht von 16000 ermittelte, wäre für x = etwa 13 zu setzen.

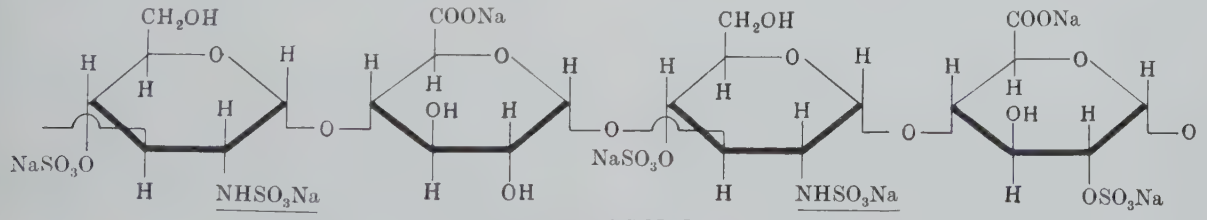
Betreffend die Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung erscheint als besonders beachtlich, daß nach den Untersuchungen von Wolfrom die Aminogruppe sulfiert und nicht azetyliert ist – dies im Gegensatz zur Auffassung von Fürth[2], wonach alle in der Natur vorkommenden Aminozuckerverbindungen am Stickstoff azetyliert sein sollen.

Neueren Untersuchungen von Jorpes[3] sowie von Jaques[4] verdanken wir die Erkenntnis, daß in der Natur nicht nur *ein* Heparin vorkommt, daß also der Begriff «Heparin» nicht eng umrissen ist. Bezüglich der biologischen Wirksamkeit bestehen große Unterschiede zwischen den Heparinen verschiedener Tierarten, ferner gibt es Heparine mit verschiedenem Gehalt an Schwefelsäureresten. Kompliziert werden die Verhältnisse noch dadurch, daß das Molekulargewicht der Heparine offenbar in ziemlich großen Grenzen schwanken kann[5].

Heparin wirkt hemmend auf die Blutgerinnung; es besitzt ausgeprägte Antithrombineigenschaften, hemmt jedoch auch die Thrombokinasewirkung (siehe 1. Mitteilung Studer-Winterstein[6]) und greift damit auch in die erste Gerinnungsphase ein. Es ist anzunehmen, daß es auch auf weitere Gerinnungsfaktoren hemmend wirkt.

Dank seinen Eigenschaften als polyvalentes Antikoagulans und dank seiner geringen Toxizität (siehe Reinert-Winterstein[7]) wird Heparin seit einigen Jahren mit ausgezeichnetem Erfolg zur Behandlung von Thrombose und Embolie verwendet. Nach Jorpes[8] ist, dank richtig geleiteter Heparinmedikation, die Mortalität durch Embolie in den schwedischen Kliniken von 18% auf 1% gesunken. Eine zusammenfassende Darstellung über die therapeutische Verwendung des Heparins gibt in neuester Zeit Merz[9].

Ist die chemische Natur des Heparins verhältnismäßig spät aufgedeckt worden, so haben Untersuchungen über die Bestandteile des Knorpels schon im vergangenen Jahrhundert zur Erkenntnis geführt, daß die sogenannte Chondroitinschwefelsäure aus Glukuronsäure, Chondrosamin (Galaktosamin), Essigsäure und Schwefelsäure aufgebaut ist (Schmiedeberg, 1891[10]).



$[C_{24}H_{31}O_{35}N_2S_5Na_7]_x$.

[1] Wissenschaftliche Laboratorien der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

[2] J. McLean, Amer. J. Physiol. *41*, 250 (1916).

[3] W. H. Howell, Amer. J. Physiol. *71*, 553 (1924–1925).

[4] W. H. Howell, Bull. Johns Hopkins Hospital *42*, 199 (1928).

[5] A. Fischer und A. Schmitz, Z. Physiol. Chem. *216*, 264, 274 (1933).

[6] J. E. Jorpes, Biochem. J. *29*, 1817 (1935).

[7] J. E. Jorpes, Z. physiol. Chem. *278*, 7 (1943).

[8] A. F. Charles und A. R. Todd, Biochem. J. *34*, 112 (1940).

[9] M. Reinert und A. Winterstein, Arch. internat. pharmacodyn. thérap. *62*, 47 (1939).

[10] M. L. Wolfrom und F. A. Rice, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 532 (1946).

[11] M. L. Wolfrom, R. Montgomery, J. V. Karabinos und P. Rathgeb, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 5796 (1950).

[1] R. Jensen, O. Snellmann und B. Sylvén, J. Biol. Chem. *174*, 265 (1948).

[2] O. Fürth, H. Hermann und R. Scholl, Bioch. Z. *271*, 395 (1934).

[3] J. E. Jorpes und S. Gardell, J. Biol. Chem. *176*, 267 (1948).

[4] L. B. Jaques, E. T. Walters und A. F. Charles, J. Biol. Chem. *144*, 229 (1942).

[5] S. hiezu Marbet-Winterstein, Helv. physiol. acta *9*, 29 (1951).

[6] A. Studer und A. Winterstein, Helv. physiol. acta *9*, 6 (1951).

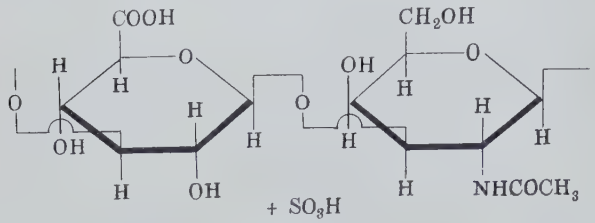
[7] M. Reinert und A. Winterstein, Arch. internat. pharmacodyn. thérap. *62*, 47 (1939).

[8] J. E. Jorpes, Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. *3*, 320 (1947 bis 1948), ferner J.E. Jorpes, *Heparin* (Oxford Univ. Press, London, 1946) S. 113).

[9] W. R. Merz, *Die Behandlung der Thrombose und Lungenembolie mit Anticoagulantien* (S. Karger, Basel 1950).

[10] O. Schmiedeberg, Arch. exp. Path. Pharm. *28*, 355 (1891).

In neuester Zeit haben die Untersuchungen von Meyer[1] zur Aufstellung folgender Formel geführt: $[C_{14}H_{19}O_{14}NSNa_2]_x$.



Das Molekulargewicht der Chondroitinschwefelsäure wird von Meyer zu 27000–32000 angenommen, für x ist darnach etwa 60 zu setzen.

Meyer[2] gelang auf Grund fermentchemischer Untersuchungen der Nachweis, daß in der Natur verschiedene Chondroitinschwefelsäuren vorkommen (siehe hiezu Tabelle Seite 44).

Der Impuls für die intensivere Bearbeitung der Mukopolysaccharide geht aus von der sich rasch mehrenden Erkenntnis über deren große physiologische Bedeutung.

Letztere liegt beachtlicherweise in zwei ganz verschiedenen Richtungen:

1. Die Mukopolysaccharide Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure sind integrierende Bestandteile der Grundsubstanz des Mesenchyms (Rheuma- und Arteriosklerose-Problem).

2. Heparin, ein Mukoitin-polyschwefelsäureester, stellt das physiologische blutgerinnungshemmende Agens des tierischen und menschlichen Organismus dar (Thrombose-Problem).

Gewisse tierische Organe bzw. Gewebe, wie Kornea, hyaliner Knorpel, Sehnen usw., sind besonders reich an Mukopolysacchariden. Sie zeichnen sich gegenüber anderen Geweben dadurch aus, daß sie keine direkte Blutversorgung besitzen. In diesen eigenartigen Geweben hängen Stoffwechsel und Stofftransport offenbar in hohem Maße von der physikalisch-chemischen Natur der Mukopolysaccharide ab. Letztere greifen als Grund- und Kittsubstanzen des Bindegewebes maßgeblich in den Salz- und Wasserhaushalt der Gewebe, der Gelenkflüssigkeiten, des Glaskörpers usw. ein.

Man kann sich sehr wohl vorstellen, daß geringste Veränderungen in Viskosität und Permeabilität solcher Grundsubstanzen zu ebenso bedeutungsvollen pathologischen Störungen führen können wie zum Beispiel eine mangelhafte Versorgung anderer Gewebe mit Blut. Hyaluronidase oder ähnliche Fermente, welche auf die Mukopolysaccharide einwirken, dürften in entscheidender Weise in den Stoffwechsel dieser avaskulären Gewebe eingreifen.

Bekanntlich beobachtet man bei rheumatischen Erkrankungen pathologische Veränderungen der Grundsubstanzen. Letztere quellen im Anfangsstadium dieser Krankheit zunächst auf. Diese physikalisch-chemische Veränderung in den Grundsubstanzen führt letzten Endes zur sogenannten fibrinoiden Degeneration[3].

Das Bestehen engster Beziehungen zwischen Grundsubstanzen und Rheumaproblem wird durch verschiedene Arbeiten aus neuester Zeit erhärtet[1]. Abrahams und Glynn[2] halten es für möglich, daß das hypothetische toxische Agens der rheumatischen Erkrankung Antipolysaccharid-Qualitäten besitzt[3]. Nach den Untersuchungen von Layton[4] soll Cortison – allerdings in hohen Dosen – die Biosynthese der Chondroitinschwefelsäure hemmen. Nach Sallmann[5] ist der Glukosamingehalt des Blutes bei rheumatischen Erkrankungen stark erhöht. Er soll nach Reiner[6] durch ACTH oder Cortison normalisiert werden.

Von Interesse sind in diesem Zusammenhange auch die Beobachtungen von Donzelot und Kaufmann[7], wonach rheumatische Erkrankungen durch Heparinzufuhr gebessert werden. Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise folgendermaßen deuten: Heparin besitzt nach McClean[8], Alburn[9] und anderen Autoren[10] Antihyaluronidase-Eigenschaften. Nach Seifter[11] soll die Verabreichung von Hyaluronidase zu rheumaähnlichen Krankheitssymptomen führen und eine latente rheumatische Erkrankung aufflackern lassen. Heparin wäre darnach imstande, die schädliche Wirkung von Hyaluronidase zu neutralisieren. Nach den Befunden von Abrahams[12] besteht bei Patienten mit akutem Gelenkrheumatismus eine Heparinresistenz, welche durch Heparin-Inaktivierung im Blute bedingt wird.

Nach Rinehart und Greenberg[13] spielen pathologische Veränderungen in den Grundsubstanzen auch bei der Arteriosklerose eine Rolle[14].

Außer der direkten Beeinflussung des Blutgerinnungsvorganges scheinen dem Heparin weitere, noch nicht näher erforschte pharmakodynamische Wirkungen zuzukommen. Nach den Befunden von Hahn[15], Weld[16], Waldron[17], die neuerdings durch Brown[18] bestätigt wurden, bewirkt Heparin ein Verschwinden der Chylomikronen aus dem Blut und kann damit in den Fettstoffwechsel eingreifen. Nach Gofmann *et al.*[19] verhindert Heparin das Auftreten eines Lipoproteins im Blut, welches am Zustandekommen der Arteriosklerose[20] beteiligt ist. Bei Kaninchen, die mit einer cholesterinreichen, Arteriosklerose erzeugenden Diät gefüttert wurden, läßt sich die experimentelle Arteriosklerose durch Heparin

[1] K. H. Meyer, M. E. Odier und A. E. Siegrist, Helv. chim. acta *31*, 1400 (1948).

[2] Karl Meyer und M. M. Rapport, Science *113*, 596 (1951).

[3] R. E. Neumann, zitiert nach F. Klinge im *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Bd. IX/2 (J. Springer, Berlin 1934), Seite 117.

[1] P. Klemperer, Amer. J. Med. *10*, 405 (1951).

[2] G. Abrahams und L. Glynn, Clin. Sci. *8*, 171 (1949); ebenda *10*, 1 (1951).

[3] Siehe hiezu auch D. Glick und B. Sylvén, Science *113*, 388 (1951).

[4] L. Layton, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *76*, 596 (1951); Arch. Biochem. Biophys. *32*, 224 (1951).

[5] B. Sallmann, J. Birkeland und C. T. Gray, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *76*, 467 (1951).

[6] M. Reiner, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *74*, 529 (1950).

[7] E. Donzelot und H. Kaufmann, Presse Médicale *1949*, 989.

[8] D. J. McClean, J. Path. Bact. *54*, 214 (1942).

[9] H. E. Alburn, Fed. Proc. S. 1949.

[10] Siehe zum Beispiel G. I. M. Swyer, Biochem. J. *42*, 32 (1948).

[11] Siehe hiezu J. P. Magner *et al.*, Arch. Dermat. Syph. *64*, 322 (1951), Fußnote 6.

[12] G. Abrahams und L. Glynn, Clin. Sci. *8*, 171 (1949); ebenda *10*, 1 (1951).

[13] J. F. Rinehart und L. D. Greenberg, Arch. Path. *51*, 12 (1951).

[14] Siehe hiezu auch S. K. Abul-Haj, J. Watson und J. F. Rinehart, Science *114*, 237 (1951).

[15] P. F. Hahn, Science *98*, 19 (1943).

[16] C. B. Weld, Canad. M. A. J. *54*, 69 (1945).

[17] J. M. Waldron, Fed. Proc. *7*, 130 (1948).

[18] W. D. Brown, 18. Int. Phys. Kongreß, Kopenhagen 1950. Abstracts. Seite 130.

[19] J. W. Gofman (Vortrag Amer. Med. Assoc. 13. Juni 1951).

[20] Siehe hiezu J. W. Gofman *et al.*, J. Gerontology *6*, 105 (1951); Science *111*, 166 (1950).

weitgehend verhindern. Angina pectoris soll durch Heparin gebessert werden.

Auffallend ist die rasche Ausschwemmung von Ödemen unter Heparin, offenbar als Folge einer vermehrten Durchblutung – Rekanalisation der Venen bzw. Vasodilatation[1].

Die günstige Wirkung des Heparins bei Pemphigus wird auf eine Beeinflussung der Hyaluronidase zurückgeführt[2].

Unsere eigenen Untersuchungen beziehen sich zunächst auf Mukopolysaccharid-Schwefelsäureester mit blutgerinnungshemmender Wirkung, greifen jedoch auch über das Problem der eigentlichen Grundsubstanzen.

Bei der Fabrikation von Heparin aus Rinderlungen sind uns in großer Menge Nebenprodukte angefallen, die ihrer chemischen Natur nach – ebenso wie Heparin selbst – als Mukoitinschwefelsäureester anzusprechen sind. Ihrem physiologischen Verhalten nach unterscheiden sich diese Nebenprodukte vom Heparin durch ihre sehr viel geringere gerinnungshemmende Wirkung. Während reinstes Heparin aus Rindslungen (α-Heparin)[3] eine Wirksamkeit von 130 IE/mg besitzt, weist das Gemisch der Nebenprodukte einen Titer von nur 3–5 IE/mg auf.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, aus diesen Nebenprodukten einheitliche Substanzen abzutrennen und zu untersuchen, in welchen Beziehungen sie zum Heparin stehen.

Prinzipiell zeigte die Fraktionierung, daß es sich um ein Sammelsurium verschiedenster sulfierter und auch unsulfierter Mukopolysaccharide handelt. Einen kleinen Teil der Nebenprodukte haben wir auf Grund ihrer chemischen und physiologischen Eigenschaften (keine gerinnungshemmende Wirkung) als eigentliche Chondroitinschwefelsäuren identifizieren können. Eine Rohfraktion von Chondroitinschwefelsäure, die eine spezifische Drehung von −25° aufwies, bestand gemäß der elektrophoretischen Untersuchung immer noch aus zwei verschiedenen Substanzen.

Die Kopffraktion dieses Gemisches erwies sich als identisch mit einer Chondroitinschwefelsäure aus Knorpel ($[\alpha]_D = -30°$). Daneben isolierten wir eine schwefelfreie Hexuronsäure-Aminozucker-Verbindung, die sich gegenüber der Chondroitinschwefelsäure durch sehr hohe Viskosität auszeichnet. Diese Substanz ist linksdrehend (−40°); ob es sich um eine Vorstufe der Chondroitinschwefelsäure bzw. des β-Heparins und damit um eine neue Grundsubstanz oder um eine Hyaluronsäure handelt, wird die nähere Untersuchung ergeben.

Eine Chondroitinschwefelsäure besonderer Art läßt sich aus dem Gemisch der Nebenprodukte in Form ihres in verdünntem Methanol unlöslichen Zinksalzes abtrennen. Diese Substanz zeigt im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Chondroitinschwefelsäuren eine ausgeprägte blutgerinnungshemmende Wirkung (36 IE/mg)[4]. *Bezüglich der biologischen Wirksamkeit ist diese Verbindung zu den Heparinen zu zählen, während sie, wie die nachfolgenden Befunde zeigen, bezüglich der chemischen Natur zu den Chondroitinschwefelsäuren zu rechnen ist.*

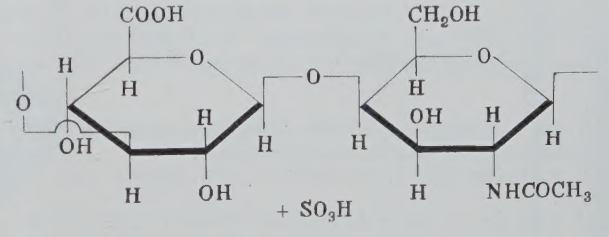
Wir bezeichnen das neue Antikoagulans als β-Heparin, weil es im Gegensatz zum α-Heparin offenbar β-glukosidische Bindung besitzt; α-Heparin dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts (+ 50°), β-Heparin nach links (− 60°). Seiner elementaren Zusammensetzung nach entspricht das β-Heparin der Summenformel $(C_{14}H_{19}O_{14}NSNa_2)_x$, identisch mit derjenigen der Chondroitinschwefelsäure[1].

Als Bausteine enthält das β-Heparin Uronsäure, Schwefelsäure, Essigsäure und Galaktosamin (Chondrosamin) in äquimolarem Verhältnis. Auch bezüglich der Bausteine läßt sich das β-Heparin von Chondroitinschwefelsäure nicht unterscheiden.

Beachtlich ist die Tatsache, daß das β-Heparin im Gegensatz zu den bis jetzt bekannten Heparinen als Aminozucker nicht Glukosamin, sondern Galaktosamin enthält. *Das neue blutgerinnungshemmende Agens gehört somit in die Galaktosaminreihe.*

Nach Wolfrom[2] und Jorpes[3] ist im α-Heparin die Aminogruppe sulfiert, die hohe biologische Aktivität wird auf diese Gruppierung zurückgeführt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen α- und β-Heparin besteht darin, daß in letzterem die Aminogruppe – ebenso wie bei der Chondroitinschwefelsäure – azetyliert ist.

In Analogie zu den von Wolfrom und Mitarbeitern[2] sowie von Meyer und Mitarbeitern[4] für α-Heparin, Chondroitinschwefelsäure und Hyaluronsäure aufgestellten Formeln läßt sich für das β-Heparin folgende Grundformel zur Diskussion stellen:



Dem β-Heparin schenken wir besondere Beachtung, weil es sich durch Sulfierung in einen Mukoitin-trischwefelsäureester verwandeln läßt, der mit 160 IE/mg eine höhere gerinnungshemmende Wirkung aufweist als reinstes α-Heparin.

Bei unseren Untersuchungen über die Heparine der verschiedenen Tierarten ist es uns gelungen, aus Schafslungen ein Antikoagulans zu isolieren, das nahe verwandt ist mit dem β-Heparin aus Rindslungen. Es handelt sich ebenfalls um einen am Stickstoff azetylierten Mukoitin-*mono*-schwefelsäureester, der links dreht ($[\alpha]_D = -67°$) und dessen Aminozucker auch Galaktosamin ist. *Dieses β-Heparin aus Schafslungen ist durch die hohe Aktivität von 70 IE/mg ausgezeichnet.* Es ist bemerkenswert, daß in der Natur Mukoitin-mono- und -tri-schwefelsäureester vorkommen, die sich ihrer Antithrombinaktivität nach nicht voneinander unterscheiden.

[1] Siehe hiezu R. P. Ahlquist, J. Amer. pharm. Ass. *39*, 370 (1950).

[2] J. P. Magner, R. C. Manson und A. Pepple, Arch. Derm. Syph. *64*, 320 (1951).

[3] Das heißt der sogenannte Mukoitin-tri schwefelsäureester, den wir als α-Heparin bezeichnen. Betreffend Nomenklatur siehe auch R. Marbet und A. Winterstein, Helv. chim. acta *34*, 2311 (1951).

[4] Alle Aktivitätsbestimmungen wurden nach der von A. Studer und A. Winterstein ausgearbeiteten Methode durchgeführt. Helv. physiol. pharmacol. acta *9*, 6 (1951).

[1] K. H. Meyer *et al.*, Helv. chim. acta *31*, 1400 (1948).

[2] M. L. Wolfrom, R. Montgomery, J. V. Karabinos und P. Rathgeb, J. Amer. Soc. *72*, 5796 (1950).

[3] J. E. Jorpes, H. Boström und V. Mutt, J. Biol. Chem. *183*, 607 (1950).

[4] K. H. Meyer, M. E. Odier und A. E. Siegrist, Helv. chim. acta *31*, 1400 (1948). – K. H. Meyer und J. Fellig, Exper. *6*, 186 (1950).

Diese überraschend hohe Aktivität läßt sich mit den uns zur Zeit bekannten Tatsachen über Konstitution (zum Beispiel Sulfierungsgrad und Sulfierungsart) und Wirkung in dieser Körperklasse nicht erklären. Unterschiede im Molekulargewicht[1] reichen wohl kaum aus, um den Aktivitätsunterschied zwischen dem β-Heparin aus Rindslungen und demjenigen aus Schafslungen zu erklären.

Mukoitinschwefelsäureester

	α-Heparin aus Lunge $[\alpha]_D = +50^0$ IE/mg	β-Heparin aus Lunge $[\alpha]_D = -60^0$ IE/mg	α-Heparin aus Leber $[\alpha]_D = +50^0$ IE/mg
Rind	130	36	110–160
Schaf . . .	86	70	132
Hund. . . .	240	—	280
Pferd. . . .	80	—	119
Katze . . .	90	—	117
Schwein . .	56	—	—

Heparinmonoschwefelsäureester aus Rindslungen		etwa	16 IE/mg
Uroheparin		etwa	50–70 IE/mg[2]
Chondroitinschwefelsäure[3]	A aus Knorpel	$[\alpha]_D$	$= -30°$
Chondroitinschwefelsäure	B aus Haut	$[\alpha]_D$	$= -50°$
Chondroitinschwefelsäure	C aus Sehnen	$[\alpha]_D$	$= -20°$

Wir neigen zur Annahme, daß die verschiedene biologische Aktivität der Chondroitinschwefelsäure (Knorpel CHS. = 0 IE, β-Heparin aus Rindslungen 36 IE/mg und β-Heparin aus Schafslungen 70 IE/mg) auf Unterschiede im strukturellen Feinbau dieser Moleküle zurückzuführen ist. In diesem Sinne sprechen auch die Versuche von Meyer[1], gemäß welchen sich die von ihm isolierten drei Chondroitinschwefelsäureester A, B und C den verschiedenen Hyaluronidasepräparaten gegenüber verschieden verhalten.

In nebenstehender Tabelle geben wir eine Übersicht über die bis jetzt bekannten Heparine[2], bzw. Chondroitinschwefelsäuren.

Wir stellen fest, daß uns die Forschung der letzten Jahre zur Erkenntnis geführt hat, nicht mehr von *einem* Heparin oder *einer* Chondroitinschwefelsäure zu sprechen. Es handelt sich bei den Mukoitinschwefelsäureestern vielmehr um eine größere Klasse von Naturstoffen, die sich – bei ähnlicher Konstitution der einzelnen Vertreter – stark in ihrer biologischen Wirksamkeit voneinander unterscheiden.

Summary

In a short survey it is pointed out that mucopolysaccharides are encountering increasing interest in view of their great physiological and therapeutic importance. Heparin seems to have in addition to its well-known direct anticoagulant effects some further pharmacodynamic properties which have up to now not been sufficiently elucidated. The so-called ground substances –chondroitin sulfuric acids and hyaluronic acids—may play an important part in the exchange of metabolic products as well as in the transportation of nutritive and active compounds in the tissues and organs without vascularisation. The class of the mucopolysaccharides is considerably larger than was assumed a few years ago. In confirmation and extension of former findings we were able to show that in the different animal species several heparins are encountered and that in addition there are found anticoagulant factors—designated by us as β-heparins—which are built up by the same components as chondroitin sulfuric acid but differ from the heparins already known by their amino sugar.

[1] Über die Molekulargewichte verschiedener Mukoitinschwefelsäureester wird K. Dialer, Basel, berichten.

[2] R. Marbet und A. Winterstein, Helv. physiol. acta *9*, 24 (1951).

[3] Karl Meyer und M. M. Rapport, Science *113*, 596 (1951).

[1] Karl Meyer und M. M. Rapport, Science *113*, 596 (1951).

[2] L. B. Jaques, E. T. Walters und A. F. Charles, J. Biol. Chem. *144*, 229 (1942).

Unsere medizinischen Spezialpräparate
werden von unserer Forschungs-
abteilung in enger Zusammenarbeit mit
führenden Instituten und Kliniken
entwickelt.

Die Präparate unter der Marke

CILAG

werden von den Aerzten wegen ihrer
stets gleichbleibenden hohen Qualität
und Zuverlässigkeit allgemein geschätzt.

CILAG AKTIENGESELLSCHAFT SCHAFFHAUSEN

Neuerscheinung

ANDREAS SPEISER, Professor an der Universität Basel

Elemente der Philosophie und der Mathematik

Eine Anleitung zum inhaltlichen Denken

(1952) 116 Seiten. Ganzleinen Fr. 11.45

1. Präludium. In diesem wird gezeigt, wie in der Philosophie eine Erfindungsmethode erforderlich ist und wie die Systematik seit Plato auf der Aufstellung und Ausdeutung einer Formel beruht.

2. Die Fuge. Im Anschluß an Hegels Logik als dem letzten und vollständigsten Versuch wird der von Fichte aufgestellte sechsteilige Operator vierstimmig durchgeführt. Vom Sein gelangt man über das Wesen zum Begriff. Es werden die Grundbegriffe der Philosophie und der Mathematik, in letzterer vor allem die Zahlen, das Kontinuum, die Funktion, die Bewegung, in ersterer das Urteil und der Schluß sowie das Objekt durchkonstruiert.

Dieser kurze Leitfaden wendet sich an alle diejenigen, welche sich für die Grundlagen im weitesten Sinne interessieren, und er gibt eine Anleitung zur Technik des Denkens, die sich jeder aneignen soll, der sich mit diesen Fragen befaßt.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL

Leben und Umwelt

Naturwissenschaftliche Monatsschrift mit Aufsätzen aus dem Gebiete der Biologie, Medizin, Technik, Geologie und Länderkunde, allgemeinverständlich, aber wissenschaftlich einwandfrei geschrieben.

Herausgegeben von der Vereinigung Schweizerischer Naturwissenschaftslehrer.

Redaktion:

Dr. L. JECKLIN, Basel (Gesamtleitung); Dr. A. GERBER, Basel; PD. Dr. H. ANNAHEIM, Basel

12 Hefte im Jahr für nur Fr. 5.20

Aus dem Inhalt der letzten Nummern:

Dr. H. STOHLER: Zur Technik der einfachsten Sonnenuhren; H. ZÜLLIG: Das Leben in einer Schwefelquelle; O. WEBER: Flugwetterdienst; H. HILTY: Die alkoholische Gärung; E. FLÜCKIGER: Die Limnologie, eine ökologische Wissenschaft; Dr. J. SCHLITTLER: Wie alt werden unsere Bäume?; A. STIERLIN: Die Cerviden in der Schweiz; A. SCHNEIDER: Malaria; E. SCHEURER: Der Tagesbedarf des Menschen an Vitamin C; Dr. M. DE QUERVAIN: Zur Entstehung der Lawinen; Dr. F. SCHMIDT: Gedanken um die wilde Katze; WALTER KÜBLER: Herstellung von Lavendelblütenöl; Dr. A. GENSLER: Verschwinden unsere Gletscher?; Dr. ERNST ERZINGER: Merkwürdige Bauformen im Puschlav; W. SACKMANN: Krankes Bienenvolk; H. FEHLINGER: Ein Salzsee bei Wien; E. ZIMMERLI: Der Untergang einer Landschaft; PAUL DROZ: Aufgaben und Probleme der Unterwasserphotographie; ULRICH SENN: Monstein, ein Bündner Bergbauerndorf; Dr. MAX SCHÜEPP: Der Lebenslauf einer Gewitterwolke; A. SCHNEIDER: Freon; E. MEILI: Die Herstellung von Portlandzement; Dr. C. JENAL: Die Ursachen der Eiszeit; H. SCHENK: Viscum album L. auf Cotoneaster; Dr. R. T. MÜLLER: Atombau, Wertigkeit und chemische Bindung.

Verlangen Sie bitte ein Gratisprobeheft beim

VERLAG H. R. SAUERLÄNDER & CO., AARAU